

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Materiais Dentários e Prótese



greb
Groupe de Recherche en Écologie Buccale



UNIVERSITÉ
LAVAL

Cássio do Nascimento

Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector
protético sob aplicação de carga
- avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard* –

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Materiais Dentários e Prótese

Cássio do Nascimento

**Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector
protético sob aplicação de carga**

- avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard* -

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, para concorrer ao Título de Doutor, pelo curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração: Reabilitação Oral.

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Materiais Dentários e Prótese

Cássio do Nascimento

**Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector
protético sob aplicação de carga**

- avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard* -



UNIVERSITÉ
LAVAL

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, para concorrer ao Título de Doutor, pelo curso de Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi

Orientador no Exterior: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Ribeirão Preto
2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento, Cássio do

Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético sob aplicação de carga - avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard*. Ribeirão Preto, 2010.

196 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Albuquerque Junior, Rubens Ferreira de

1. interface implante-conector protético. 2. contaminação bacteriana. 3. saliva. 4. DNA-Checkerboard.

NASCIMENTO, C. **Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético sob aplicação de carga - avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard*.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Aprovado em: ____/____/ 2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus,

pela presença constante,

pelas oportunidades

e pela força interior que me impulsiona a seguir em busca dos meus sonhos.

Ao meu pai Ariovaldo José do Nascimento

e minha mãe Célia Regina Pagnozzi do Nascimento

que sempre ensinaram o caminho certo a seguir.

Obrigado pelo amor incondicional, suporte emocional nos momentos de

necessidade e confiança.

Obrigado por serem tão especiais, por me ouvir e me apoiar sempre.

Ao meu irmão Ariovaldo José do Nascimento Júnior,

pela grande amizade, companheirismo e por tão intenso amor.

Agradecimentos Especiais

*Aos meus orientadores, Prof. Dr. Rubens Ferreira de Albuquerque Junior,
Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi e Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves*

*Por suas constantes presenças como orientadores, mestres e acima de tudo,
grandes amigos, sempre um exemplo de disciplina, serenidade, determinação e
dedicação à odontologia e à pesquisa. Agradeço pela oportunidade de
trabalharmos juntos, por todos os ensinamentos transmitidos, e pela enorme
contribuição na minha formação. Meu reconhecimento e sinceros
agradecimentos.*

À Profa. Dra. Izabel Yokô Ito e à Profa. Dra. Nádia Monesi

*Sua dedicação à ciência e à prática docente, a beleza de seus ensinamentos, a
amizade, paciência e disponibilidade foram fundamentais para a realização
deste trabalho.*

Ao Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro

*Por sua atenção, disponibilidade, sugestões e companheirismo nos momentos de
dificuldade.*

À empresa SIN (Sistema de Implante, São Paulo)

*Pela doação dos implantes e componentes, necessários para elaboração do
presente trabalho, sem os quais seria inviável a realização do mesmo.*

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, onde obtive minha formação como Cirurgião-Dentista e Mestre, e pela oportunidade da realização do curso de Doutorado, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon e do Vice-Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nas pessoas da chefe do Departamento Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos

À atual Coordenadora da Pós-Graduação na área de Reabilitação Oral, Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, a sua antecessora Prof. Dr. Iara Augusta Orsi, pelo excelente trabalho realizado no curso e incansável incentivo.

Aos colegas de pós-graduação, pelo excelente convívio.

*Aos amigos e colegas de doutorado, Flávio Henrique Carriço Nogueira
Fernandes e Paola Kirsten Miani, pela companhia e auxílios constantes*

*Um agradecimento especial aos Professores
Evandro Watanabe, João Paulo Mardegan Issa
e Raphael Freitas de Souza,
pelo auxílio imprescindível para a realização deste trabalho, pelo
companheirismo e sobre tudo pela amizade.*

*Às funcionárias
Regiane de Cássia Tirado, Ana Paula Xavier, Ana Paula Macedo, Adriana
Cláudia Lapria Faria, Regiane C. Moi Sacilotto e Isabel Cristina Galino Sola,
por todo suporte a mim oferecido durante o curso e pelo carinho constante e
tão agradável convívio.*

*Aos professores, colegas e funcionários do Groupe de Recherche en Ecologie
Buccale da Faculté de Médecine Dentaire da Université Laval (Canadá), na
pessoa do Diretor Prof. Dr. Daniel Grenier, pelo apoio no desenvolvimento
deste trabalho e excelente convívio.*

*À CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização do estágio de Doutorado
Sanduíche no Canadá*

*A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração
deste trabalho,*

Muito obrigado.

Sumário

Resumo	10
Abstract	13
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISTA DA LITERATURA	21
2.1 Osseointegração dos implantes	22
2.2 Adaptação dos componentes protéticos aos implantes.....	35
2.3 Colonização bacteriana dos implantes e doença peri-implantar.....	49
2.4 Técnicas moleculares de diagnóstico microbiológico	60
3. PROPOSIÇÃO	70
4. MATERIAIS E MÉTODOS	72
4.1 Ensaio de simulação de carga sobre os implantes	73
4.2 Avaliação da contaminação bacteriana pelo método de hibridização DNA- Checkerboard	101
5. RESULTADOS	124
5.1 Resultado do teste piloto de carga.....	125
5.2 Resultados dos testes de extração e amplificação de DNA	126
5.3 Quantificação da contaminação bacteriana pelo DNA Checkerboard	136
6. DISCUSSÃO	147
7. CONCLUSÕES	164
8. REFERÊNCIAS	167
9. APÊNDICE	185

RESUMO

RESUMO

NASCIMENTO, C. **Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético sob aplicação de carga - avaliação *in vitro* pelo método *DNA Checkerboard***. 2010. 200 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A passagem bacteriana através da interface entre implante e conector protético com a conseqüente colonização dos implantes tem sido relatada em diversos estudos na literatura. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a passagem de espécies bacterianas da saliva humana para o interior dos implantes através da interface implante-conector protético após simulação de carga cíclica controlada. Foram avaliados 60 implantes de um sistema de 2 componentes e seus respectivos conectores protéticos, divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de conexão utilizado: hexágono externo, hexágono interno e cone morse. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos (n=10), submetidos à aplicação de carga e controle. Previamente ao teste, amostras do interior dos implantes foram coletadas para servirem como controle negativo da contaminação. Os conectores foram adaptados aos implantes com um torque final de 20 Ncm, de acordo com a recomendação do fabricante. Os conjuntos foram imersos em saliva humana e submetidos a 500.000 ciclos de carga com uma força de 120 N ou incubados em 35°C durante 7 dias sem aplicação de carga (controle). A eventual contaminação do interior dos implantes foi avaliada após o período experimental usando o método DNA Checkerboard. Microrganismos

foram encontrados no interior dos implantes de todos os tipos de conexões avaliadas após o teste de carga cíclica. Os grupos cone morse apresentaram os menores valores de contagem bacteriana nos grupos submetidos a ciclagem de carga e controle. Os implantes submetidos à carga cíclica apresentaram maiores valores de contagem bacteriana do que seus respectivos controles no hexágono externo e interno. Nenhuma espécie bacteriana foi encontrada abrigando o interior dos implantes antes do teste de contaminação (controle negativo). Os implantes do grupo cone morse apresentaram menores quantidades de microrganismos nas duas condições testadas. Pode-se concluir que espécies bacterianas provenientes da saliva humana podem penetrar através da interface implante-conector protético com ou sem a simulação de carga cíclica, e que a aplicação de carga contribuiu para o aumento da contaminação nos implantes com conexão hexagonal externa e interna.

Palavras-chave: interface implante-conector protético, contaminação bacteriana, saliva, DNA-Checkerboard.

ABSTRACT

ABSTRACT

NASCIMENTO, C., **Bacterial leakage along the implant-abutment interface after loading simulation. *In vitro* evaluation by DNA Checkerboard method.** 2010. 200 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Bacterial leakage along the implant-abutment interface with consequent species harboring the inner parts of two-part dental implant systems has been reported. The aim of this *in vitro* study was to evaluate the bacterial leakage from human saliva to the internal part of the implants along the implant-abutment interface under loading conditions. Sixty dental implants, 20 for each external or internal hexagon and morse cone connection, and their conical abutments were used in this study. Each connection was sub-divided in 2 groups (n=10), loaded implants and control (unloaded). Previously to the bacterial leakage test, samples from the inner parts of the implants were collected with sterile microbrushes as negative control of contamination. The abutments were tightened to 20 Ncm on the implants. The assemblies were immersed in human saliva and loaded with 500,000 cycles of 120 N in experimental or incubated for 7 days at 35°C in control group. After this period, possible contamination of the internal parts of the implants was evaluated using the DNA Checkerboard method. Microorganisms were found in the internal surfaces of all connections evaluated. Morse cone connection presented the lowest count of microorganisms in control and loading group. Loaded implants present higher counts of microorganisms than control group in external and internal hexagon. No microorganisms were found in the samples

recovered from the implants before contamination test (negative control). It can be concluded that bacterial species from human saliva may penetrate along the implant-abutment interface under unloaded and loaded conditions, and morse cone connection presented the lowest count of microorganisms.

Key-words: dental implants, bacterial leakage, saliva, DNA Checkerboard

1. INTRODUÇÃO

O emprego de implantes dentais osseointegráveis na prática odontológica tem sido extensivamente relatado na literatura e apresenta um alto índice de sucesso quando corretamente indicado e executado (BRÄNEMARK et al., 1985). Publicações recentes, entretanto, têm demonstrado que, além de fatores oclusais desfavoráveis, microrganismos presentes na cavidade oral, em especial os relacionados à doença periodontal, são responsáveis pelos maiores índices de insucesso dos implantes (BRAGGER et al., 2005; COVANI et al., 2006).

Alguns autores demonstraram haver uma relação entre a presença de microrganismos e o estado de saúde ou de doença dos tecidos periodontais e peri-implantares (QUIRYNEN et al., 2006). A presença de bactérias periodontopatogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com periodontite próximos a implantes dentais são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes (BOTERO et al., 2005).

Sistemas de implantes de dois componentes, Bränemark compatíveis, embora sejam os mais usados, apresentam espaços entre o implante e conector protético, os quais podem servir de abrigo para microrganismos potencialmente capazes de provocar reações inflamatórias nos tecidos peri-implantares (QUIRYNEN et al., 1994). A passagem de algumas espécies de bactérias pela rosca de fixação dos conectores e próteses, do interior dos implantes para o meio externo e em sentido contrário, foi observada em diversos estudos *in vitro* (STEINEBRUNNER et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2009). Alguns estudos *in vivo* também reportaram a passagem de microrganismos

através da interface implante-conector protético (CALLAN et al. 2005; COSYN et al. 2009).

Na verdade, muitas dúvidas ainda existem quanto aos princípios biomecânicos que regem o funcionamento do conjunto quando a função mastigatória é exercida (BRUNSKY et al., 2000). Sabe-se, entretanto, que um ponto chave dessa questão é a adaptação entre os componentes. A falta de adaptação pode causar danos mecânicos, como fraturas e desaperto de parafusos, além de danos biológicos, como mucosites e peri-implantites, relacionados à dificuldade de higienização e retenção de bactérias nos espaços entre os componentes (QUIRYNEN et al., 1994; ROMERO et al., 2000).

Khraisat et al. (2006) demonstraram que a presença e o tamanho das fendas entre os implantes e conectores podem variar de acordo com o tipo de conexão dos implantes e com as características estruturais dos conectores. Byrne et al. (1998) reportaram através de microscopia eletrônica de varredura desajustes verticais entre implantes e conectores variando de 36 a 86 micrometros, e horizontais de -66 a 11 micrometros.

Outros estudos demonstraram que a aplicação de carga é um fator que pode afetar a adaptação dos implantes e seus componentes, e conseqüentemente, a passagem de microrganismos através da junção implante-conector. Steinebrunner et al. (2005) observaram que bactérias podem penetrar e colonizar o interior de implantes com intermediários retidos por parafuso devido a espaços na interface implante-conector, e que o grau de penetração bacteriana pode variar de acordo com a quantidade de ciclos de carga às quais os conectores são submetidos. De acordo com os autores, a aplicação de carga é responsável

por uma diminuição da estabilidade da conexão entre implantes e componentes protéticos.

Os estudos avaliando a ocorrência de infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético têm em sua maioria utilizado métodos de cultura microbiana para detectar microrganismos aeróbios e anaeróbios. Um problema inerente a estes métodos é que espécies fastidiosas e microrganismos anaeróbios estritos, não são identificados. Estima-se que aproximadamente 50% da microbiota oral não são cultiváveis pelos métodos convencionais (ARANK et al., 1969). Além disso, células bacterianas não viáveis, mas ainda assim capazes de liberarem substâncias agressivas aos tecidos peri-implantares, não podem ser quantificadas por métodos de cultivo.

Por outro lado, uma técnica recentemente desenvolvida de hibridação de DNA, conhecida como DNA Checkerboard, possibilita a identificação de até 45 espécies microbianas em até 28 amostras simultaneamente. É uma técnica rápida e sensível, que consiste no cruzamento das amostras contra as sondas dos microrganismos a serem estudados, preparadas a partir de seu DNA genômico (SOCRANSKY et al., 1994).

Constantemente novos sistemas de implantes são desenvolvidos, apresentando novas propriedades físico-químicas, tratamentos de superfície e adaptação dos componentes. Considerando a frequência com que os implantes vêm sendo utilizados na prática odontológica e a importância de uma perfeita adaptação entre seus componentes, principalmente em relação às condições extremas de aplicação de carga as quais são submetidos durante a mastigação, julgamos relevante a avaliação da possível passagem bacteriana através da

interface implante-conector protético entre os três sistemas de conexão existentes no mercado após a simulação de carga cíclica e na ausência de carga.

2. REVISTA DA LITERATURA

2. 1 Osseointegração dos implantes

A substituição dos dentes naturais ausentes, visando o restabelecimento funcional e estético do sistema estomatognático é uma forma de tratamento há muito tempo utilizada na odontologia. Implantes confeccionados em diversos materiais e diferentes formatos foram desenvolvidos para este propósito (MANGINI; SCHIOCHETT, 1999).

A implantologia somente ganhou impulso a partir das publicações de Branemark et al. (1969) que definiram a osseointegração como a conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vital e a superfície de titânio do implante, capaz de receber carga funcional, sem a presença de tecido conjuntivo entre as duas estruturas.

O sucesso em longo prazo dos implantes depende fundamentalmente do desenho da remodelação óssea formada ao redor do implante imediatamente após sua inserção na loja óssea, o que pode favorecer ou não a manutenção deste na cavidade oral. A excessiva perda óssea não é aceitável, pois leva a um aumento no desenvolvimento de bolsas favorecendo o acúmulo de biofilme bacteriano subgengival, aumentando, desta forma, o risco de infecção na porção cervical do implante, o que comprometeria o sucesso da implantação. É possível observar que até nos implantes considerados satisfatoriamente osseointegrados há, com o passar do tempo, uma reabsorção óssea progressiva. No entanto, para que seja considerado um processo fisiológico, há um limite para essa perda

óssea. Cox e Zarb (1987) definiram como limites aceitáveis uma perda óssea de aproximadamente 1,3 milímetros no primeiro ano e 0,1 milímetros por ano nos anos subsequentes.

Smith & Zarb (1989) descreveram alguns critérios para a avaliação do tratamento com implantes, baseados em investigações científicas. A revisão da literatura e análise dos resultados de pesquisas indicam que seis critérios deveriam ser observados para que o tratamento com implantes apresente sucesso clínico: 1) ausência de mobilidade do implante quando avaliado individualmente; 2) não deve haver radioluscência ao redor do implante; 3) a perda óssea média vertical anual não deve ser maior que 0,2 mm após o primeiro ano de função; 4) deve haver ausência de dor, desconforto ou infecção freqüente na região do implante; 5) o tratamento não deve comprometer a estética; 6) uma taxa de sucesso de 85% após 5 anos e 80% para dez anos de observação são os níveis mínimos aceitáveis para o tratamento com implantes osseointegrados.

Diversos fatores estão relacionados à qualidade da remodelação óssea após a colocação dos implantes, dentre os quais, a maneira como o estresse mecânico é transferido do implante para o osso. De acordo com Skalak (1983), tanto o osso como os implantes não podem ser submetidos a forças além daquelas que estão aptos a receber. Como o titânio é mais rígido e resistente que o osso, é mais provável que uma possível falha ocorra no osso ou na união entre o osso e o titânio. Ainda segundo o autor, a prótese forma uma conexão firme ao implante resultando em uma estrutura unificada, onde prótese, implante e osso atuam como uma unidade dependente. Assim, qualquer desajuste da prótese em relação aos implantes resultará em estresses internos na prótese, implante e osso.

Esses estresses não podem ser detectados através de inspeção visual, mas podem ocasionar falhas mesmo sem a atuação de forças externas.

A estrutura da superfície dos implantes também exerce papel fundamental no processo de remodelação do osso adjacente. Shin et al. (2006) realizaram um estudo para avaliar a influência do tratamento da superfície dos implantes no nível ósseo marginal após carga funcional. Os autores instalaram 3 tipos de implantes em pacientes da seguinte maneira: o primeiro grupo recebeu 35 implantes com o colo usinado; o segundo grupo recebeu 34 implantes com o colo tratado superficialmente; e um terceiro grupo recebeu implantes com colo tratado superficialmente e mini-roscas. A análise radiográfica após 12 meses em função revelou diferenças significantes entre os grupos estudados. O grupo com tratamento de superfície e mini-roscas no colo apresentou uma perda óssea de $0,18 \pm 0,16$ mm, enquanto o grupo com colo tratado superficialmente apresentou uma perda óssea de $0,76 \pm 0,21$ mm e o grupo com colo usinado mostrou uma perda óssea de $1,32 \pm 0,27$ mm. Com os resultados observados ao final do estudo, os autores sugerem a utilização de implantes com roscas no colo podem garantir a manutenção da crista óssea após a osseointegração dos implantes.

O momento ideal para a aplicação de carga sobre os implantes ainda é um fator de divergência entre diversos autores, e continua sendo alvo de diversas investigações. Os primeiros estudos publicados relacionados ao assunto, como os de Branemark et al. (1985) e Albrektsson et al. (1990), determinaram a espera de um período de 3 a 6 meses de submersão dos implantes (cicatrização) para poderem ser carregados proteticamente. Segundo os autores, esse seria o tempo necessário para permitir uma adequada formação óssea ao redor dos implantes,

evitando as infecções e a migração epitelial. Este período de submersão também contribui para manter o implante estável, evitando movimentações, o que poderia comprometer a osseointegração.

O primeiro trabalho longitudinal com a utilização de implantes em duas fases cirúrgicas foi publicado por Adell et al. (1981). Neste trabalho, 2768 implantes de 371 pacientes foram avaliados durante um período de 15 anos. O índice de sucesso de osseointegração observado na maxila foi de 81% e de 91% na mandíbula. Nesse mesmo trabalho, verificou-se uma reabsorção de 1,2 mm no primeiro ano de função, com perda de 0,1 mm a cada ano subsequente. Os autores relacionaram o sucesso com a qualidade do procedimento cirúrgico e da reabilitação protética, com o estabelecimento de protocolos bem definidos, ressaltando a importância do íntimo contato entre o osso e o implante para que ocorra a osseointegração.

Buser et al. (1997) avaliaram clínica e radiograficamente o prognóstico do tratamento reabilitador com implantes durante um período de oito anos em pacientes parcial ou totalmente desdentados. Mil e três pacientes receberam um total de 2359 implantes e foram reabilitados com a colocação de próteses fixas ou removíveis, sendo então, acompanhados. Após o período de cicatrização, os pacientes foram chamados para avaliação clínica e radiográfica, sendo os implantes classificados em osseointegrados ou com falha precoce. Os implantes considerados com sucesso tiveram o tratamento protético realizado e foram acompanhados por um período de 8 anos. Durante o período de cicatrização, 13 implantes se apresentaram falhos e não foram incluídos na análise da fase protética. Durante os 8 anos seguintes, 127 implantes foram perdidos do

acompanhamento clínico e radiográfico. A análise dos resultados mostrou uma taxa de sucesso em 90% após 8 anos de colocação das próteses sobre os implantes demonstrando a viabilidade de manutenção deste tratamento reabilitador em longo prazo.

Leonhardt et al. (2003) analisaram os resultados, em longo prazo, do tratamento de implantes infectados com a utilização de técnicas cirúrgicas periodontais e uso de antimicrobianos. Foi observado que dos 26 implantes acompanhados por um período de 5 anos, 7 foram perdidos, 4 continuaram a perder osso, 9 não mudaram o nível ósseo e 6 ganharam tecido ósseo. Esta série de casos mostrou que é possível, em alguns casos, a manutenção de implantes seriamente comprometidos por peri-implantite na cavidade oral quando o controle periódico por parte do cirurgião dentista e colaboração do paciente são realizados de forma eficiente.

Ricci et al. (2004) realizaram um estudo retrospectivo para avaliar a perda óssea marginal em um grupo de pacientes tratados com implantes de dois componentes do sistema *Frialit-2*. Cinquenta e um pacientes com 112 implantes participaram do estudo, sendo que 10,7% dos implantes foram colocados na região anterior e 89,3% na região de pré-molares e molares. As próteses foram fixadas com parafusos (13,4%) ou cimentadas (86,6%), dentre as quais 46,4% representavam elementos isolados e 53,6% próteses fixas posteriores de 3 ou mais elementos. Após 5 anos de função, 100% dos implantes avaliados estavam em função e a média de reabsorção óssea foi de 2,17 mm. Entretanto, 32 implantes (28,6%) apresentaram perda óssea maior que 3 mm. Entre as complicações protéticas observou-se 7,1% de afrouxamento de parafusos em 6

pacientes, tendo sido causado, provavelmente, por hábito para-funcional. Em 2 pacientes, as próteses foram consideradas inadequadas em relação a sua adaptação. As avaliações iniciais de 12, 24 e 36 meses apresentaram perda óssea em níveis aceitáveis, não indicativas de perda óssea progressiva ou de alguma patologia. Os autores alertam para a necessidade de novos estudos avaliando o tempo necessário para que uma prótese desajustada resulte em perdas ósseas consideráveis prejudiciais ao sucesso dos implantes.

Palmer et al. (2000) analisaram o desempenho clínico e radiográfico de dentes e implantes, unidos entre si por uma prótese fixa de três elementos e submetidos a cargas funcionais normais por um período de três anos. Para tal, 19 indivíduos com edentamento posterior bilateral na maxila ou mandíbula, com oclusão em dentes naturais ou próteses fixas, foram reabilitados mediante colocação de implantes. Radiografias padronizadas e registros clínicos foram realizados anualmente. Analisando os dados, notou-se um aumento de profundidade de sondagem entre os intervalos de acompanhamentos clínicos. No entanto, não foi observado nenhum sangramento à sondagem, tanto na área de implante, como na região dos dentes. Não houve intrusão dos dentes ligados aos implantes em nenhum dos 19 pacientes analisados. Este experimento comprovou, mesmo sem análise microbiológica, a eficácia dos implantes quando submetidos às cargas por um período prolongado de tempo, evidenciando o sucesso clínico desse tipo de tratamento reabilitador.

Quirynen et al. (2005) avaliaram os aspectos clínicos e microbiológicos de implantes após 10 anos de sua colocação em pacientes edentados totais e reabilitados com próteses. Trinta e sete indivíduos participaram deste estudo.

Todos os pacientes foram tratados com próteses totais superiores convencionais e próteses inferiores sobre implantes (Nobel Biocare AB) por pelo menos 10 anos. Dois grupos de pacientes foram selecionados. O grupo 1 consistiu de 25 pacientes tratados com próteses removíveis do tipo *overdenture*. O grupo 2 consistiu de 12 pacientes reabilitados com próteses totais fixas. O registro das condições periodontais foi realizado em visitas periódicas ao mesmo periodontista, no qual foram analisadas a presença ou ausência de biofilme bacteriano em 4 sítios dos implantes dentais, sangramento dos tecidos moles ao redor dos conectores, profundidade de sondagem, recessão tecidual e o nível do *attachment*. Amostras bacterianas subgingivais foram removidas de dois implantes de cada paciente para posterior análise microbiológica. As amostras foram analisadas utilizando a técnica de hibridação DNA Checkerboard. Após 10 anos de carga, a microbiota subgingival dos implantes de todos os grupos, tanto os que utilizaram como tratamento reabilitador próteses removíveis ou fixas, foram comparáveis entre si, apresentando alta prevalência das espécies bacterianas *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis*, consideradas potenciais causadores da doença peri-implantar. A média do índice de placa, sangramento à sondagem e altura do nível ósseo marginal não foi significativamente diferente entre os grupos, passado o período de acompanhamento clínico. Desta forma, evidenciaram-se a possibilidade de viabilidade clínica da manutenção destes implantes em ambos os tipos de tratamento reabilitador na cavidade oral.

Bornstein et al. (2005) avaliaram clínica e radiograficamente, a taxa de sucesso de implantes de titânio em pacientes por um período de 60 meses. Um

total de 104 implantes foi incluído na análise. Após o período de cicatrização de 6 semanas, todos os implantes foram colocados em função por meio da cimentação de coroas fixas. Durante a fase de cicatrização do alvéolo e de aplicação de cargas sobre as próteses quatro implantes foram perdidos, sendo excluídos da análise. Nos 100 implantes restantes, foi realizada manutenção do controle da quantidade de biofilme bacteriano no interior do sulco peri-implantar, onde foi observada uma redução significativa em relação ao sangramento à sondagem no intervalo estipulado. Houve uma redução gradativa tanto da média de profundidade de sondagem quanto da distância entre o ombro do implante e a margem gengival. A estabilidade dos implantes foi observada durante todo o período de análise. Um pequeno aumento da distância nos períodos de 3 meses e 5 anos, entre o ombro do implante e a crista óssea marginal foi estaticamente observada. Os resultados obtidos só vieram a corroborar outros estudos que comprovam possibilidade de manutenção do sucesso clínico, em longo prazo, de implantes osseointegrados na sustentação de próteses fixas bem planejadas e adaptadas.

Misch et al. (2008) avaliaram de forma retrospectiva o resultado em longo prazo do tratamento com implantes unitários na região posterior da maxila ou mandíbula. Foram avaliados 1377 implantes com conexão do tipo hexágono externo colocados em 1162 pacientes. Os implantes foram avaliados em 3 fases: 1) após a cirurgia de implantação e durante a fase de cicatrização; 2) após a reabertura dos implantes até a confecção das próteses; e 3) por um período de 10 anos após a instalação das próteses. Dos 1377 implantes inseridos, 11 foram perdidos durante a fase de cicatrização, 1 foi perdido durante a fase de confecção

da prótese e 2 foram perdidos após a instalação das próteses. A taxa de sucesso cirúrgico foi de 99,2%, enquanto a taxa de sobrevivência global foi de 98,9%, em média, após 61 meses de observação (variando de 12 a 125 meses). Segundo os autores, o uso de implantes unitários como substitutos para dentes posteriores é um tratamento viável a longo prazo.

Com o sucesso do tratamento com os implantes e a consagração da osseointegração, alguns autores (SCHNITMAN, 1990; HENRY; ROSENBERG, 1994; RANDOW, 1999) passaram a carregar os implantes de maneira precoce, sem mais esperar este período de cicatrização óssea de 3 a 6 meses. Esse procedimento é atualmente conhecido como carga imediata. A partir desses primeiros estudos da década de 1990, inúmeros outros surgiram relatando resultados satisfatórios.

Randow et al. (1999) fizeram uma comparação clínica e radiográfica entre pacientes totalmente edêntulos que receberam implantes na região inter-forame seguindo o protocolo clássico de cicatrização (carga tardia) com pacientes que receberam implantes com a aplicação de carga imediata. Após 18 meses da instalação, nenhum dos implantes foi perdido em ambos os grupos avaliados, sendo que a média de perda óssea ao redor dos implantes com carga imediata foi de 0,4 mm, enquanto que nos implantes de carregamento tardio foi de 0,8 mm. Esses resultados, portanto, levaram os autores a concluir que o procedimento de carga imediata é uma técnica confiável.

Com o objetivo de avaliar a neo-formação óssea ao redor de implantes submetidos à carga imediata, Romanos et al. (2002) instalaram 36 implantes do tipo cone morse (Ankylos) na região posterior de mandíbulas de macacos. No

grupo controle, os implantes foram submetidos ao protocolo convencional de 2 estágios cirúrgicos. Após o período de cicatrização, os implantes foram reabertos e coroas provisórias em acrílico foram instaladas, para posterior restauração com coroas metálicas. No lado contra-lateral (grupo experimental), os implantes foram submetidos à carga imediata, com a mesma seqüência de próteses do grupo controle. Após 3 meses das próteses definitivas (metálicas) em função, os macacos foram sacrificados e amostras do osso adjacente aos implantes foram examinadas histológica e histomorfométricamente. Segundo os autores, os achados histológicos entre os grupos não mostraram diferenças qualitativas significantes. A análise histomorfométrica mostrou que o osso ao redor dos implantes carregados imediatamente apresentou uma densidade significativamente maior quando comparados aos implantes de dois estágios cirúrgicos.

Crespi et al. (2007) avaliaram por um período de 18 meses o comportamento clínico e radiográfico de implantes com conexão do tipo hexágono externo submetidos a carga imediata em alvéolos de dentes recém extraídos. No trabalho, 27 pacientes receberam 150 implantes com carga imediata nos alvéolos frescos e 10 em alvéolos cicatrizados (controle). Todos receberam coroas provisórias no ato da cirurgia e coroas metalocerâmicas cimentadas sobre um conector protético após 5 meses. O acúmulo de placa era de 2% e passou para 5% após os 18 meses. Já o índice de sangramento passou de 3% para 5,3% após os 18 meses. Não houve nenhum tipo de mobilidade ou soltura da prótese de ambos os grupos após esse período. Os achados radiográficos revelaram uma perda óssea média de $0,65 \pm 0,58$ mm na mesial e $0,84 \pm 0,69$ mm na distal dos

implantes mandibulares, e $1,13 \pm 0,51$ mm na mesial e $1,24 \pm 0,60$ mm na distal dos implantes maxilares. Não houve diferenças quanto à qualidade da remodelação óssea entre implantes esplintados e não esplintados. Os autores concluíram que o procedimento de carga imediata pode perfeitamente ser utilizado tanto em osso cicatrizado quanto em alvéolos frescos.

István e Katalin (2009) avaliaram o sucesso em longo prazo do tratamento reabilitador com implantes submetidos à carga imediata. Os resultados clínicos foram avaliados após um período de 10 anos subsequentes a colocação dos implantes. O grupo experimental de carga imediata foi constituído de 184 pacientes e 258 implantes. O controle foi realizado com 121 pacientes, com 192 implantes colocados com a técnica submersa. A taxa de sucesso dos implantes com a cirurgia tradicional de duas fases foi de 97,4%. A taxa de sucesso dos implantes com aplicação de carga imediata foi de 95,75%. Segundo os autores, o prognóstico de implantes carregados imediatamente não apresentou diferenças significantes em relação à técnica tradicional.

Block et al. (2009) realizaram um estudo clínico com os objetivos de determinar se existe uma diferença significativa na resposta dos tecidos moles e duros, comparando os níveis de reabsorção da crista óssea marginal, em implantes colocados imediatamente após a remoção dos dentes quando comparados aos implantes colocados no leito ósseo após 4 meses de enxerto e cicatrização. Um total de 76 pacientes foram recrutados e randomizados em 2 grupos de tratamento. Todos os implantes foram colocados na maxila dos pacientes. Nos pacientes do grupo 1, os dentes foram extraídos, realizado enxerto ósseo e os implantes colocados após 4 meses de cicatrização dos alvéolos. No

grupo 2, os implantes foram colocados imediatamente após a extração. Todos os implantes foram imediatamente restaurados com coroas unitárias provisórias. Acompanhamento radiográfico padronizado foi realizado a cada 6 meses a partir da instalação dos implantes até 2 anos após a reabilitação protética. Medidas dos tecidos moles foram feitas a partir de pontos de referência padronizados. Um total de 55 pacientes completaram o estudo proposto. Vinte e um pacientes foram excluídos do estudo, 5 por causa da perda do implante, um tratado fora do protocolo estabelecido devido à perda do osso labial encontrado no momento da remoção do dente, 11 devido à realocação geográfica e 4 por problemas de saúde que comprometeram a continuidade do estudo. As análises mostraram não haver diferenças significantes entre os grupos avaliados em relação aos níveis ósseos. Os níveis ósseos ao redor dos implantes se modificaram em relação aos níveis basais durante os primeiros 6 meses de estudo, apresentando uma leve redução. A resposta da crista óssea para colocação imediata ou a longo prazo de um implante em um sítio de extração na região maxilar com carga imediata foi similar às mudanças no tecido ósseo alveolar. Houve uma diferença significativa na posição da margem gengival facial com uma posição mais apical da margem gengival no grupo de colocação tardia em comparação com o grupo de colocação imediata dos implantes. O suporte da gengiva marginal ao redor das coroas provisórias foi 1 mm maior no grupo com colocação imediata dos implantes quando comparado com o grupo de colocação tardia.

Schwarz et al. (2010) avaliaram de forma prospectiva o sucesso em longo prazo de implantes carregados imediatamente na área intra-foraminal da mandíbula totalmente edentada, bem como a taxa de sucesso das próteses fixas

suportadas pelos implantes (FDP). Trinta e sete pacientes (18,9% do sexo masculino, com idade média de 64,5 anos) foram selecionados para o estudo. Cento e oitenta e cinco implantes de duas partes (Branemark compatíveis) foram colocados na área intra-foraminal mandibular (cinco implantes por paciente). Imediatamente após a colocação dos implantes, uma estrutura metálica foi fabricada e as próteses fixas fabricadas sobre a estrutura. Após 2 semanas da cirurgia de colocação, os implantes foram rigidamente conectados e restaurados com as próteses fixas. Durante o período de observação de 1-8 anos (média de 4,5 anos), um total de 32 implantes apresentaram complicações e foram excluídos do estudo. Dezenove implantes foram perdidos em 10 pacientes, resultando em uma sobrevida cumulativa de 89,7%. Nove implantes em cinco pacientes não osseointegraram, porém, não foram removidos porque a estabilidade no tecido conjuntivo era aceitável e não havia presença de inflamação. No entanto, o sucesso acumulado caiu para 84,9%. Quatro implantes em três pacientes apresentaram sinais clínicos de peri-implantite (2,2% de todos os implantes). Ao final do estudo, uma única prótese fixa precisou ser removida após a falha de osseointegração dos 5 implantes instalados. Além disso, 10 fraturas da estrutura protética ocorreram em 6 pacientes e 3 próteses tiveram que ser adaptadas ou modificadas. Os autores concluíram que apesar do carregamento precoce dos implantes ter funcionado bem para a maioria dos pacientes com mandíbulas edentadas, a carga imediata está associada a um maior número de complicações relacionadas aos implantes do que em outros estudos investigando o carregamento tardio. Ainda segundo os autores, por causa das complicações

substanciais protéticas e de manutenção dos implantes, este procedimento não pode ser generalizadamente recomendado.

Rocuzzo et al. (2009), realizaram uma revisão sistemática de 18 estudos clínicos relatando o sucesso no carregamento precoce ou imediato dos implantes. No entanto, apesar dos resultados satisfatórios, os autores alertam para a necessidade de mais estudos clínicos randomizados com um maior número de pacientes para que os resultados possam ser mais conclusivos.

2. 2 Adaptação dos componentes protéticos aos implantes

Com os diversos trabalhos longitudinais publicados na literatura, começou-se a observar que a maioria das falhas nos tratamentos com implantes osseointegrados estava relacionada com os componentes protéticos e próteses, como mostrou Lekholm et al. em 1985.

Adaptação passiva, segundo Sahin e Cehreli (2001), é sinônimo de uma adaptação ideal. Teoricamente, uma infra-estrutura deveria proporcionar uma adaptação passiva, não induzindo tensão nos componentes dos implantes e ao osso adjacente. Entretanto, segundo os autores, uma adaptação passiva é impossível de ser obtida, uma vez que os procedimentos clínicos e laboratoriais utilizados na confecção de infra-estruturas são inadequados para proporcionar tal adaptação. Complicações como afrouxamento e fratura dos parafusos de fixação, fratura dos conectores, da infra-estrutura e material de cobertura têm sido documentadas e relacionadas à desadaptação dos componentes dos sistemas de

implantes. Ainda segundo os autores, não há estudos clínicos longitudinais suficientes na literatura comprovando que as falhas nos implantes são atribuídas especificamente à falta de adaptação dos componentes. Uma adaptação marginal aceitável entre os componentes não significa a obtenção de uma adaptação passiva. Os autores sugerem que o melhor método para se avaliar a passividade de uma infra-estrutura seria a análise de tensão gerada em cada conector e/ou componente protético antes e após o apertamento dos parafusos ou a cimentação da mesma. Cada passo durante a confecção de uma infra-estrutura influencia a adaptação final e, segundo os autores, as técnicas e os materiais utilizados atualmente não são precisos dimensionalmente, havendo a necessidade de novos estudos.

Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente vários sistemas de implantes, com diferentes formatos, superfícies, tamanhos e distâncias entre as roscas, assim como diferentes possibilidades de conexão entre implantes e conectores protéticos. O sistema mais utilizado, e talvez por ser o primeiro proposto, também o mais bem documentado, é o sistema de conexão hexagonal externa proposto por Branemark et al. (1969). Esse sistema possui uma plataforma de conexão hexagonal que age como um mecanismo anti-rotacional, sendo, juntamente com o parafuso protético, o responsável pela estabilidade mecânica do conjunto implante-conector protético.

Sorensen et al. (1991), avaliaram a fidelidade nas interfaces de próteses unitárias, instaladas sobre 4 diferentes sistemas de implantes com conexão hexagonal externa, com o objetivo de verificar se a adaptação das interfaces entre os diferentes sistemas poderia interferir no acúmulo de biofilme e conseqüente

desenvolvimento de inflamação gengival. Foram comparadas as interfaces implante-conector protético e conector protético-prótese. A avaliação foi realizada após a confecção de infra-estrutura sobre o cilindro de ouro, seguida da aplicação de porcelana e instalação manual com uma chave de torque. A análise foi feita por meio de observação direta, com auxílio de um microscópio com unidade de medição e aumento de 200x. Os 4 grupos apresentaram uma adaptação entre interfaces semelhantes, sem diferenças significantes.

Binon e MacHugh, em 1996, avaliaram a influência da liberdade rotacional em implantes de hexágono externo de dimensões diferentes, na estabilidade da união parafusada. Para o experimento, utilizaram 2 grupos diferentes de conectores protéticos UCLA não segmentados, sendo um grupo com conector hexagonal pré-fabricado em ouro com seu parafuso de fixação em titânio; e outro com conector hexagonal externo calcinável e seu correspondente parafuso de fixação. Assim, conectores cônicos totais metálicos foram obtidos com 8 mm de altura por 8 mm de largura. Como grupo controle, utilizaram conectores pré-fabricados em ouro. Nas amostras, foram aplicados 20 Ncm de torque inicialmente e depois de um milhão de ciclos foram reapertados com 30 Ncm. Em todas as amostras foram aplicadas cargas cíclicas utilizando a metodologia desenvolvida por Binon previamente, com 133,3 Ncm de carga, uma rotação anti-horária de 28 ciclos por minuto, 1.150 ciclos por minuto de carga vertical até ocorrer a falha do parafuso. Seus resultados mostraram uma média de liberdade rotacional de 5° em ambos os grupos testes, sendo que todas as amostras do grupo pré-fabricado afrouxaram entre 384.215 e 409.170 ciclos, na primeira parte do experimento. No segundo grupo teste, só um implante falhou em 597.366 ciclos, as outras

amostras permaneceram estáveis durante o primeiro milhão de ciclos, sendo que o segundo grupo teste teve uma maior resistência ao afrouxamento, na primeira e segunda parte do experimento. Encontrou-se também uma correlação direta entre a liberdade rotacional do conjunto implante/conector e o afrouxamento do parafuso, sendo que esta união é mais resistente ao afrouxamento quanto menor é a liberdade rotacional.

Dellow et al. (1997) relataram que o acoplamento impreciso dos componentes pode influenciar no prognóstico em longo prazo de tratamentos com implantes. Através de microscopia de varredura foram analisadas as micro-fendas (falta de adaptação vertical) e a discrepância entre o conector e implante quanto ao perfil (falta de adaptação horizontal). Após a análise de 4 sistemas diferentes de implantes, todos com conexão do tipo hexágono externo, os autores concluíram que certos sistemas de implantes e conectores são intercambiáveis e que a precisão da adaptação encontrada é semelhante, ou às vezes, excede os critérios propostos pelo sistema originalmente descrito por Branemark (Branemark System). As variações nestes casos não foram maiores que 10 mm de espaço entre os componentes. Os autores observaram que há incompatibilidade entre dois sistemas, SteriOss e Southern.

Hagiwara et al. (1997), com o propósito de avaliar a compatibilidade tridimensional de 3 sistemas diferentes de implantes: Implant Innovations (3i), Nobelbiocare (NP) e Steri-Oss (SO), verificaram a adaptação da interface implante-conector e conector-cilindro de ouro entre os componentes de um mesmo sistema, e entre componentes de sistemas diferentes, todos com conexão do tipo hexágono externo. O assentamento dos componentes foi padronizado

através de chave de torque e as medidas de desajuste horizontal e vertical, para cada interface foi medida por microscopia eletrônica. Os componentes 3i apresentaram excelente compatibilidade, enquanto os componentes do sistema Nobel Biocare demonstraram pobre adaptação. Os autores concluíram que a associação de sistemas diferentes pode ser considerada aceitável, porém, uma compatibilidade segura e estável é obtida com componentes do mesmo sistema.

Byrne et al., em 1998, relataram a insuficiência de informação a respeito da adaptação dos conectores protéticos aos implantes. Os autores observaram as adaptações entre conectores pré-fabricados, totalmente calcináveis e pré-fabricados modificados em laboratório em duas condições: interface do conector e implante, e assentado por parafuso de ouro no interior e na base do conector. Seis combinações de conectores e diferentes sistemas de implantes com conexão hexagonal externa foram avaliados no estudo: Grupo 1-implante Nobelpharma e conector CeraOne com torque de 32 Ncm do parafuso de ouro sem o ciclo de queima da porcelana; Grupo 2- implante 3i e conector STR com torque de 32 Ncm do parafuso de ouro sem o ciclo de queima da porcelana; Grupo 3- implante 3i e conector UCLA de padrão plástico com torque de 20 Ncm do parafuso de ouro com queima da porcelana; Grupo 4- implante Nobelpharma e conector UCLA de padrão plástico com torque de 20 Ncm do parafuso de ouro com queima da porcelana; Grupo 5- implante 3i e conector UCLA pré-fabricado com parafuso de ouro e torque de 32 Ncm com ciclo de queima da porcelana; Grupo 6- implante 3i e conector UCLA pré-fabricado com parafuso de ouro e torque de 32 Ncm sem ciclo de queima da porcelana. Para os grupos 3, 4 e 5 foi feito um enceramento de um UCLA e confecção de uma matriz de silicone, para o enceramento uniforme

das amostras. As amostras foram fundidas com liga de ouro/paládio. Os grupos 3, 4 e 5 fundidos foram submetidos ao ciclo de queima da porcelana. Os conectores foram parafusados e presos a uma base de resina. Os conjuntos conectores/implantes foram seccionados no sentido horizontal e levados para análise em microscópio eletrônico. Foram analisadas 5 amostras por grupo. As medidas das fendas externas dos grupos 1, 3 e 4 apresentaram grande discrepância: $86 \pm 19\mu\text{m}$, $74 \pm 33\mu\text{m}$ e $84 \pm 26\mu\text{m}$. As medidas verticais foram, respectivamente: $35 \pm 17 \mu\text{m}$, $15 \pm 16 \mu\text{m}$, $68 \pm 44 \mu\text{m}$, $66 \pm 33 \mu\text{m}$, $31 \pm 30 \mu\text{m}$ e $17 \pm 20 \mu\text{m}$, para os grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6. As maiores desadaptações foram apresentadas pelos conectores UCLA de plástico fundidos em ouro/paládio. Os autores concluíram que os conectores protéticos pré-fabricados possuem adaptação superior aos fundidos em laboratório e sugerem a necessidade de um maior controle de padronização para as fundições realizadas em laboratório.

Sartori, em 1999, comparou a estabilidade que se estabelece entre conectores protéticos de diversas empresas (Nobel Biocare, 3i e Conexão fabricados em ouro; e Conexão e Carbontec fabricados em plástico) e seus respectivos cilindros protéticos. A adaptação marginal, observada em microscópio ótico, encontrou medidas que variaram de 5,7 a 10,49 μm quando os cilindros eram fabricados em ouro e de 17,8 μm a aproximadamente 20 μm quando fabricados de plástico. Após as leituras iniciais, os cilindros receberam enceramentos, foram incluídos e fundidos com ligas à base de ouro, de prata/paládio e de níquel/cromo, e novamente analisados. As medidas variaram de 5,8 a 20,4 μm quando os cilindros de ouro foram fundidos com as ligas de ouro e prata/paládio, e de 32,1 a 141 μm quando os cilindros de plástico foram fundidos

com a liga de níquel/cromo. Os resultados demonstraram que os cilindros usinados em plástico sofrem variabilidade de comportamento em relação à estabilidade dimensional das margens, em grau maior do que os cilindros usinados em ouro.

Vigolo et al., em 2000, avaliaram as alterações da interface implante-conector após a fundição com um metal nobre e aplicação de cerâmica em conectores do tipo UCLA (3i) de ouro. Utilizaram 30 conectores (SGUCGI) que foram parafusados sobre análogos fixados em resina. Sobre os conectores, foram realizados enceramentos com dimensões de um incisivo central, e posteriormente fundidos com uma liga áurea de alta fusão. Nestes, foram realizadas aplicações de cerâmica seguindo as instruções do fabricante. Medidas foram realizadas antes, após a fundição e depois da aplicação da cerâmica, da profundidade e largura da porção interna do hexágono, diâmetro da base do conector UCLA, e liberdade rotacional entre a extensão hexagonal do implante e a contra-parte do conector. Os resultados evidenciaram médias de 0,620 mm, 0,621 mm e 0,620 mm na profundidade do hexágono. 2,712 mm, 2,710 mm e 2,711 mm para a largura do hexágono interno; 4,408 mm, 4,407 mm e 4,409 mm para o diâmetro da base; 6,33 min, 6,37 min e 6,38 min de liberdade rotacional (antes, após fundição e após aplicação da cerâmica respectivamente). Os autores concluíram que a adaptação dos conectores UCLA de ouro (3i) não demonstraram alterações significantes das medidas originais, ou da liberdade rotacional na superfície da porção interna. Sugeriram a seleção adequada de componentes com baixa tolerância de usinagem, seleção adequada da liga metálica e a utilização de

procedimentos clínicos e laboratoriais meticulosos para reduzir a adaptação rotacional e aumentar a estabilidade do parafuso.

Segundo Kano et al. (2006), a união dos implantes aos seus componentes está sujeita a uma perda da força inicial de torque devido à fricção a que serão submetidas as peças, e à pobre adaptação entre seus componentes. Em seu estudo, compararam a perda do torque inicial em uniões de implantes com conectores de hexágono externo pré-fabricados em titânio e calcináveis a partir do padrão UCLA. Foram avaliados 4 grupos contendo 12 amostras cada: (1) conectores de titânio pré-fabricados, (2) conectores fundidos em paladium, (3) conectores calcináveis fundidos em níquel – cromo e, (4) conectores calcináveis fundidos em cromo – cobalto. Os conectores foram unidos aos implantes com uma força de 30 Ncm, conforme instruções do fabricante. Após o torque, os parafusos foram desenroscados por 3 vezes. A média da força aplicada para abrir o conjunto (destorque) foi computada para cada conjunto. As médias do destorque, obtidas para cada grupo, foram respectivamente: (1) $92,3 \pm 2,9\%$, (2) $81,6 \pm 5,0\%$, (3) $86,4 \pm 4,6\%$ e (4) $84,0 \pm 7,0\%$. Os conectores pré-fabricados apresentaram uma maior força de destorque quando comparados aos grupos calcináveis ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos calcináveis. Os autores concluíram que os conectores pré-fabricados apresentam uma maior manutenção da força de torque inicialmente aplicada, necessitando de uma maior força para soltar o conjunto, e que os procedimentos de fundição diminuem a porcentagem do torque inicial, o que pode influenciar na estabilidade final do conjunto.

Após a vasta literatura publicada e a consagração do sistema de conexão hexagonal externa, outros sistemas foram propostos, na tentativa de melhorar algumas prováveis falhas deste sistema. Em seqüência, foram propostos e desenvolvidos os sistemas de conexão interna. Essas conexões diferem bastante da anterior quanto à maneira de se adaptar os componentes protéticos aos implantes. Diferentemente do que se observava com o hexágono externo, cada empresa desenvolveu seu próprio mecanismo e desenho de conexão interna, com características únicas, dificultando uma padronização do sistema. O principal objetivo do sistema de conexão interna em relação ao seu precursor foi conseguir uma melhor distribuição das forças mastigatórias e estabilidade mecânica entre os componentes protéticos em função, diminuindo assim os espaços existentes entre implantes e componentes.

Balfour e O'Brien (1995) compararam três diferentes tipos de conexões em implantes, conexão do tipo hexágono externo, hexágono interno e octógono interno quanto às propriedades mecânicas. A conexão hexagonal externa, quando submetida às forças laterais, apresentou danos irreparáveis quando comparado aos outros sistemas de conexão, sendo o sistema de hexágono interno o que exibiu melhor estabilidade. Os autores atribuíram os achados aos diferentes comprimentos dos componentes protéticos e ao tipo de metal utilizado (titânio comercialmente puro no hexágono externo e liga de titânio no hexágono interno).

Binon (2000) realizou uma revisão de literatura sobre as diferentes conexões protéticas disponíveis no mercado e os diferentes tipos de componentes dos sistemas de implantes. Em relação à conexão protética, o autor afirmou que

existem mais de 20 tipos diferentes de conexões, embora possam ser resumidos em 2 grandes grupos, os de conexão interna e externa. Segundo o autor, os sistemas com conexões internas resultam em uma adaptação mais estável, pois o íntimo contato entre as paredes internas do implante e o conector protético favorece a distribuição de forças, protegendo desta forma o parafuso de retenção. Ainda segundo o autor, a adaptação, liberdade rotacional, propriedades físicas e adequado torque dos componentes protéticos são fatores determinantes na estabilidade da conexão. Além disso, clinicamente deve-se procurar uma situação de adequada distribuição das cargas mastigatórias, direcionando-as ao longo eixo dos implantes e distribuindo-as em um maior número de implantes possível, além de se buscar uma passividade no assentamento da prótese.

Krennmair et al. (2002) avaliaram de forma retrospectiva o sucesso clínico de implantes do sistema *Frialit-2* com conexão hexagonal interna de 5,5mm de altura em restaurações de coroas unitárias. Em um período de 7 anos, foram avaliados 146 implantes, dos quais 93 tiveram coroas cimentadas com cimento provisório, 22 tiveram coroas parafusadas com parafuso oclusal e 31 coroas parafusadas com parafusos laterais. A taxa de sobrevida foi de 97,35% para os implantes e 96,4% para as coroas. A taxa total de complicação protética foi de 18%, tendo sido registrado fratura de componentes, afrouxamento das coroas protéticas, fratura da cerâmica e complicações teciduais. Não houve afrouxamento dos parafusos de retenção das coroas com parafuso central, apenas em 1 prótese com parafuso lateral, e 9 coroas cimentadas tiveram que ser novamente cimentadas. A taxa total de afrouxamento dos parafusos dos conectores foi de 3,5%.

Tavarez, em 2003, realizou um estudo para avaliar as alterações na interface implante-conector de sistemas com conexão interna e externa com conectores pré-fabricados ou calcináveis, através das medidas de desadaptação, e a condição de torque e destorque dos parafusos de fixação quando submetidos a ensaios de fadiga. Nos 5 grupos estudados: grupo 1- implante HE e conector UCLA com restaurações cimentadas, grupo 2- implante HI e conector pré-fabricado com restauração cimentada, grupo 3- implante HI e conector pré-fabricado com restauração cimentada, grupo 4- implante HE e conector UCLA com restauração parafusada e grupo 5- implante HE com conector CeraOne e restauração cimentada. Os corpos de prova foram submetidos a ensaios de fadiga de até 500.000 ciclos utilizando-se uma máquina de ensaio MTS 810. Testes de torque e destorque dos parafusos de fixação, e análise da desadaptação da interface implante-conector antes e após a aplicação de cargas foram realizados. Observou-se que: 1) houve diferenças no diâmetro da base de assentamento dos implantes e conectores entre 0,03 mm e 0,75 mm; e no diâmetro do hexágono/octágono entre implantes e conectores de 0,01 a 0,05 mm, sendo que no grupo que utilizou HI não foram encontradas diferenças; 2) o comprimento dos parafusos variou entre 5,95 mm e 8,83 mm, o comprimento das roscas variou entre 4,52 mm e 5,72 mm, enquanto que o diâmetro variou de 1,79 a 1,99 mm; 3) após o ensaio de fadiga, observou-se melhor adaptação dos conjuntos de implantes HE com conectores CeraOne quando comparados aos implantes HI e conectores tipo UCLA; 4) houve redução estatisticamente significativa da condição de torque dos grupos estudados após o ensaio de fadiga, e 5) houve uma forte

correlação entre a aplicação das cargas cíclicas e a diminuição da condição de torque, enquanto que nas demais variáveis não houve esta correlação.

Em 2008, Akça e Çehreli realizaram um estudo comparando a transmissão de forças por meio de modelos de fotoelasticidade e por análise extensiométrica (Strain-Gauge) na região periimplantar de diferentes tipos de implantes de conexão interna cônica. Os modelos fotoelásticos utilizados no estudo foram fabricados com implantes dos sistemas SynOcta (conexão cônica de 8°), ITI monobloco, AstraTech (conexão cônica de 11°) e Bicon (conexão interna cônica por fricção de 1,5°). Após o posicionamento dos espécimes nos modelos, foi aplicada uma carga estática de 75N em duas direções, vertical e oblíqua (20°). Os autores concluíram que a macroestrutura dos sistemas pode ter pouca relação com a perda óssea marginal, sendo muito mais importante fatores como o tratamento de superfície e a rugosidade superficial, uma vez que as conexões internas cônicas comportaram-se de maneira similar aos implantes avaliados. Concluíram ainda, que o aumento do diâmetro dos implantes pode reduzir de forma considerável o estresse distribuído na região.

Sailer et al. (2009) realizaram um estudo para avaliar a distribuição de carga em conectores de zircônia com conexão hexagonal interna ou externa. Os conectores de zircônia usados no estudo foram divididos em quatro grupos de 20 espécimes cada: A) StraumannCARES abutments sobre implantes Straumann; B) conectores Procera sobre implantes Branemark; C) conectores Procera sobre implantes NobelReplace; e D) conectores Zirabut SynOcta sobre os implantes Straumann protótipo. Em cada grupo, 10 conectores foram deixados sem coroa protética (A1 a D1) e 10 receberam coroas cerâmicas (A2 a D2). Uma carga

estática foi realizada de acordo com a norma ISO 14801 até a falha dos componentes. Os grupos com restaurações não mostraram diferenças significativas de resistência à fratura quando comparados àqueles sem restaurações. Ao final do estudo os autores concluíram que o tipo de conexão influenciou significativamente a resistência dos conectores de zircônia. Os maiores valores de resistência à fratura foram alcançados pelos conectores com conexão interna.

Mais recentemente, o sistema de conexão Cone Morse vem ganhando bastante espaço, tanto comercialmente quanto clinicamente, na implantodontia. Esse sistema é tido como mais estável biomecanicamente e mais eficiente em termos de selamento bacteriano, devido ao desenho da sua conexão.

Merz et al. (2000) realizaram um estudo no qual compararam por meio da análise de elementos finitos a conexão do tipo cone morse com a conexão externa de um sistema de implantes. Para tal, simularam a aplicação de uma carga cíclica de 380 N distribuída em 15° ou 30° em relação ao longo eixo do implante. Nas 2 direções de aplicação das forças, a conexão do tipo cone morse mostrou-se mais efetiva na distribuição de forças para os implantes, enquanto que a conexão externa concentrou muito mais força nas roscas do parafuso protético, o que, segundo os autores, pode ser um indicativo do elevado número de falhas de parafusos nos sistemas de conexão externa.

Em 2004, Nentwig publicou um estudo no qual 5439 implantes com conexão do tipo cone morse (Ankylos) foram acompanhados durante 60 meses. O autor descreve o sistema como sendo de boa capacidade de estabilidade primária, mesmo em situações onde o leito ósseo é considerado de qualidade pobre; capaz

de distribuir a carga de maneira fisiológica no osso adjacente; apresenta um melhor selamento bacteriano entre o implante e o conector protético; boa capacidade de restauração protética simples e de custo acessível. Os critérios de sucesso utilizados foram: estabilidade clínica, ausência de inflamação dos tecidos duros e moles, ausência de perda progressiva de osso ao redor do implante e satisfação do paciente. O índice de sucesso variou entre 95,8% e 98,7%, dependendo da aplicação clínica, levando o autor a concluir que o sistema é bastante satisfatório quanto à aplicabilidade clínica e à manutenção da saúde peri-implantar.

Quaresma et al. (2008) compararam por meio da análise de elementos finitos a distribuição de forças entre os sistemas de conexão do tipo hexágono interno e cone morse. Para o estudo, foram simuladas coroas metalocerâmicas adaptadas aos conectores de cada sistema, sobre as quais foi aplicada uma força de 100N na cúspide vestibular. O estresse resultante foi medido na prótese, no conector protético, no implante e no osso adjacente. O sistema de hexágono interno provocou maior estresse no osso alveolar e na prótese, porém menor no conector protético. Já o sistema cone morse resultou em um maior estresse no conector, mas com um menor estresse no osso alveolar e na prótese. De acordo com os resultados obtidos, os autores acreditam que o sistema de conexão do tipo cone morse pode levar a uma menor reabsorção óssea do que o hexágono interno, acreditando que o formato do seu conector protético dissipa, de maneira mais efetiva, as forças geradas sobre a prótese.

Independente dos diversos desenhos de sistemas de conexão propostos, uma das mais prováveis causas de falhas em implantes osseointegrados é a

inadequada adaptação entre os implantes e seus componentes protéticos. Apesar dos constantes esforços buscando limitar as adaptações entre os componentes, os espaços vazios, provenientes dessa pobre adaptação, ainda atuam como armadilhas para as bactérias presentes na cavidade oral, podendo causar reações inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares. Essas reações inflamatórias, se não controladas, podem levar ao desenvolvimento de uma peri-implantite, comprometendo o sucesso clínico dos implantes (JANSEN et al. 1997).

O formato de alguns implantes, principalmente os de 2 partes (mais utilizados nas clínicas odontológicas), favorece o acúmulo do biofilme bacteriano entre seus componentes. Isso geralmente ocorre nas interfaces implante-conector, conector-prótese e sobre as superfícies dos conectores, próteses e implantes. O tamanho da fenda existente na interface implante-conector contribui para o acúmulo de biofilme e produz um meio ideal para a colonização bacteriana. Acredita-se ainda que estes espaços se encontrem aumentados quando há forças oblíquas durante a função (STEINEBRUNNER et al. 2005).

2. 3 Colonização bacteriana dos Implantes e doença peri-implantar

A colonização da cavidade bucal, nos seres humanos, inicia-se durante o nascimento e a presença de bactérias continua por toda a vida (BOWDEN; Edwardsson, 1995). São várias as espécies bacterianas que colonizam a cavidade bucal transitoriamente. Entretanto, se houver uma superfície favorável para sua

aderência e permanência, essa colonização poder ser prolongada (SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971).

Segundo Quirynen et al. (2005), os componentes protéticos dos implantes favorecem a instalação do biofilme bacteriano e é necessário determinar a composição desse biofilme em várias etapas clínicas para compreender seu papel na manutenção da saúde periodontal ou desenvolvimento da doença. A presença ou ausência de espécies antagonistas e patógenos invasores pode influenciar a condição de saúde ou doença (HILLMAN et al., 1985; SOCRANSKY et al., 1988).

Agregatibacter actinomycetemcomitans, *Tannerella forsythensis*, e *Porphyromonas gingivalis* são considerados patógenos fundamentais para o desenvolvimento da periodontite e peri-implantite. Outras espécies, como *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus intermedius* e espiroquetas, são apontadas como possíveis patógenos associados à condição de doença (RENVERT et al., 1998; CUGINI et al., 2000; QUIRYNEN et al., 2002; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

O termo peri-implantite caracteriza a condição de doença nos tecidos de suporte dos implantes, e foi definido no Workshop Europeu de Periodontia em 1993 (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994). Este termo não é sinônimo de “falha do implante”. A presença de uma inflamação nos tecidos peri-implantares não significa que, inevitavelmente, haverá um comprometimento da osseointegração e conseqüente perda do implante (MOMBELLI et al., 2001).

A primeira colonização bacteriana nas bolsas peri-implantares caracteriza-se por um aumento no número de estreptococos anaeróbios facultativos.

Entretanto, anaeróbios gram-negativos foram isolados em alguns casos em pequenas quantidades (MOMBELLI et al., 1988). Com o decorrer do tempo, há uma diminuição dos estreptococos facultativos e um aumento na proporção de gram-negativos anaeróbios estritos, como *Fusobacterium spp.* e *Prevotella spp.* (MOMBELLI; MERICSKE-STERN, 1990). As bactérias encontradas em sítios com doença periodontal estão associadas àquelas encontradas na periodontite de adultos, com exceção dos microrganismos *Porphyromonas gingivalis* e *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (MOMBELLI et al., 1987).

Vários estudos sobre a microbiota presente ao redor de implantes odontológicos têm sido publicados, alguns dos quais relatam a presença de possíveis patógenos periodontais habitando o sulco peri-implantar de implantes que falharam (ELLEN, 1998). Os estudos sugerem que os patógenos periodontais podem estar envolvidos na perda óssea peri-implantar. Possivelmente, os microrganismos ou os produtos de seu metabolismo alojam-se nas fendas existentes entre os componentes e são responsáveis por essa perda óssea (LINDHE, et al., 1992; QUIRYNEN; VAN STEENBERGHE, 1993; ERICSSON et al., 1995; PERSSON et al., 1996).

Socransky et al. (1998) analisaram, por método de diagnóstico molecular de DNA, a microbiota subgingival de 185 pacientes, e observaram a existência de interações microbianas, dividindo-as em cinco complexos. Concluíram que a presença de uma bactéria específica está na dependência da presença de pelo menos mais uma bactéria do mesmo complexo. Segundo os autores, os microrganismos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. Forshytensis* e *T.*

denticola) estão associados às bolsas periodontais profundas, e a presença destas bactérias na microbiota gengival resulta em uma maior destruição dos tecidos periodontais. Concluíram também que estes microrganismos estão fortemente associados aos do complexo laranja, que compreende as espécies *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter*. Estes dados sugerem a existência de uma sucessão na colonização de acordo com os complexos, sendo o laranja antecessor e menos agressivo que o vermelho.

Diversos estudos publicados na literatura, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, têm demonstrado que implantes com conectores protéticos rosqueáveis estão mais freqüentemente associados à passagem de microrganismos tanto do meio externo para o interior dos implantes quanto no sentido inverso.

Traversy e Birek (1992), realizaram um estudo para determinar se ocorre infiltração de fluido ou penetração bacteriana bidirecional entre os componentes do sistema de implantes Branemark. Foram testadas as hipóteses de que: 1) existe infiltração entre a junção implante/pilar (I/P) seguramente apertada, e, 2) se os *Streptococcus sanguinis* podem penetrar no espaço entre I/P. Oito amostras foram imersas em uma solução padrão de paranitrofenol (PNP). Após 24 horas as amostras foram abertas e a quantidade de PNP foi analisada por um espectrofotômetro. Oito implantes imersos em uma solução sem PNP serviram como controle. Sete implantes com a interface selada serviram como controles positivos. No teste de infiltração de fora para dentro, foi encontrada diferença estatística ($p < 0,0001$) entre as medidas de densidade óptica. No teste de infiltração de dentro para fora, a diferença foi também significativa. Amostras estéreis dos componentes conjugados, seladas e não seladas, foram imersas em

meio de cultura, inoculado com *Streptococcus sanguinis*. A infiltração foi medida pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Após incubação de pontas de papel estéril, esfregadas contra as superfícies dos corpos-de-prova, em meio de cultura e contagem das ufc, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo experimental e o controle, mostrando que houve contaminação de *S. sanguinis* através da interface implante/pilar.

Jansen et al. (1997) relataram que os sistemas de implantes com dois estágios estão mais sujeitos a apresentar fendas e cavidades entre implantes e pilar, que podem atuar como um alçapão para bactérias, possibilitando reação inflamatória no tecido mole peri-implantar. Os autores observaram que tais fendas entre componentes são inevitáveis e sua significância clínica tem há muito sido negligenciada pelos fabricantes e clínicos. Assim, para determinar se havia infiltração microbiana por esta interface, 13 diferentes combinações pilar-implante foram feitas a partir de 9 sistemas de implantes: Ankylos, Astra, Bonelit com pilar cônico, Bonelit com pilar octa, Branemark, Calcitek, Frialit-2 com anel de silicone, Frialit-2 com pilar convencional, Ha-Ti com coroa, Ha-Ti com pilar telescópico, IMZ Titanium abutment e IMZ conector e Semados. Tais combinações foram expostas à cultura microbiana *in vitro*, na qual a penetração da bactéria *Escherichia coli* foi observada em dez espécimes de cada combinação. A extensão da fenda marginal entre os componentes pré-fabricados, medida com um microscópio eletrônico de varredura, foi menor que 10 µm em todos os sistemas. Todos os sistemas apresentaram infiltração microbiana, porém, quando o implante Frialit-2 foi unido com um anel de silicone o escoamento foi menor.

Piattelli et al. (2001), realizaram um estudo para comparar o grau de penetração bacteriana e fluidos orais em dois sistemas de implantes diferentes, um com o conector protético apenas rosqueável (SRA) e outro com o componente cimentado (CRA), utilizando 12 amostras de cada tipo. A análise por microscopia eletrônica demonstrou que a fenda entre o implante e o componente rosqueável variou entre 2 e 7 mm, enquanto que nos cimentados esta fenda foi de 7 mm. Nos cimentados, a fenda foi completamente preenchida pelo cimento. Em testes de infiltração marginal, utilizando azul de toluidina e cultura microbiana, foi possível observar que a penetração do corante e dos microrganismos ocorreu apenas pela interface implante/conector protético e para os espaços internos do sistema rosqueável. Com base nos resultados obtidos neste estudo, os autores concluíram que os conjuntos com conectores cimentados apresentam melhores resultados em relação à penetração bacteriana e de fluidos comparados aos rosqueáveis.

Rimondini et al. (2001), avaliaram, *in vivo*, a contaminação do interior de conjuntos implante/conectores, após a aplicação da carga oclusal, em implantes selados ou não com silicone. Oito conjuntos selados e nove não selados foram colocados em sete pacientes que apresentaram boa higiene oral. Dois meses após a reconstrução protética, coroas e intermediários foram removidos e a contaminação orgânica e inorgânica foram avaliadas através de microscopia eletrônica e análise de dispersão de energia através de um espectroscópio. Uma contaminação amorfa e cristalina, sugestiva de cálcio e fosfato, foi encontrada em todas as superfícies das roscas. Contaminação bacteriana foi observada mais freqüentemente no grupo não selado. Não houve diferenças quanto a tipos

morfológicos de bactérias presentes nos dois grupos, sendo cocos os microrganismos mais representativos. Os autores concluíram que, em situações clínicas, penetração de fluidos ocorre através da interface implante/conector, mas é limitada em pacientes com boa higiene oral, e que a contaminação pode ser reduzida através do selamento com silicone.

Steinebrunner et al. (2005) avaliaram *in vitro* a infiltração bacteriana por meio da interface implante-conector protético após a aplicação de carga cíclica em um simulador de mastigação. Foram avaliados implantes com conexão hexagonal interna e externa. Os autores testaram a hipótese de que a aplicação de carga diminuiria a estabilidade do conjunto levando à passagem de microrganismos através dos espaços existentes entre os componentes protéticos e implante. Cinco diferentes sistemas de implantes com 8 combinações diferentes foram testados. Coroas metálicas unitárias foram confeccionadas para conjunto. O interior dos implantes foi inoculado com uma suspensão bacteriana e os conjuntos imersos em uma solução de nutrientes. Os conjuntos foram submetidos a uma carga cíclica de 120N em uma frequência de 2Hz durante 1.200.000 ciclos. Houve diferença significativa entre os sistemas de implantes com relação ao número de ciclos mastigatórios necessários até a ocorrência de penetração das bactérias. Todos os sistemas apresentaram passagem de microrganismos através da interface implante-conector. A média de ciclos de carga até a detecção do microrganismo *E. coli* na solução em torno das amostras foi 172.800 para o sistema Brånemark; 43.200 para o Sistema Frialit-2/Hermetics; 64.800 para o Sistema Substitua-Select; 345.600 para o Sistema Camlog e 24.300 para o sistema Screw-Vent System Segundo os autores, o grau de penetração bacteriana

através da interface é dependente da precisão do ajuste entre o implante e o conector protético, o grau de micro-movimentos entre os componentes e as forças de torque usadas para conectá-los.

Proff et al. (2006) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de examinar a capacidade do microrganismo *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais causadores da peri-implantite, em passar através da interface implante-conector protético em sistemas de implantes de titânio utilizados para ancoragem ortodôntica, e avaliar sua viabilidade no interior dos implantes. Os autores avaliaram também a eficácia da gutta-percha no selamento dos espaços presentes entre os componentes e implantes. Doze implantes de titânio (Straumann, diâmetro: 3,3 mm, comprimento 5,5 mm) com seus respectivos conectores protéticos foram usados no estudo. O torque utilizado para a adaptação dos componentes protéticos foi de 20 Ncm. Seis componentes foram selados com gutta-percha antes do apertamento do parafuso e 6 foram adaptados diretamente aos implantes. Posteriormente, os implantes foram imersos em uma solução nutritiva (boullion tioglicolato com solução haemin-menadiona) contendo o microrganismo *P. gingivalis*. Amostras microbiológicas foram coletadas a partir do interior dos implantes após 24 e 72 horas e analisadas através de métodos de cultura convencional. Após a análise, os autores observaram sinais de contaminação a partir do interior dos implantes após 24 horas de incubação. Os microrganismos também foram detectados no interior dos conjuntos selados com gutta-percha. Os autores alertam para o fato de que a interface implante-conector protético constitui um meio propício para a passagem de microrganismos potencialmente causadores da doença peri-implantar, e que a sobrevivência das

espécies no interior dos implantes é possível, uma vez que estes espaços atuam como reservatórios. O estudo não apresentou nenhuma prova que o selamento dos espaços com gutta-percha é um meio eficaz para prevenir a colonização bacteriana secundária no interior dos implantes.

Duarte et al. (2006) testaram a capacidade de materiais em selar os espaços existentes entre a interface de conectores protéticos e implantes com conexão hexagonal interna ou externa. Um verniz ou selante de silicone foi aplicado na porção cervical dos implantes dos grupos experimentais. Os grupos controles permaneceram expostos. Todos os conectores foram apertados com torque de 20 Ncm, com um torquímetro manual. Os conjuntos implantes-conectores foram imersos em tubos de ensaio com 4 ml de uma suspensão contendo *Enterococcus faecalis*. Após períodos de 7, 14, 21, 35, 49 e 63 dias, a capacidade de vedação foi verificada. Os conectores foram removidos, e amostras do interior dos implantes foram coletadas com o auxílio de cones de papéis esterilizados. Os materiais obtidos foram analisados por meio de cultura microbiana convencional. Não houve diferenças significantes entre os dois materiais testados para o selamento em cada período de tempo (teste de Fisher; $P > 0,05$). Os autores concluíram, ao final do estudo, que os materiais testados não foram capazes de evitar a contaminação durante os 63 dias de experimento; a contaminação bacteriana foi verificada após 14 e 35 dias nos grupos controles e experimentais, respectivamente; e que embora os materiais testados tenham mostrado capacidades similares de vedação, os implantes dentários apresentaram contaminação bacteriana, independentemente da sua configuração hexagonal externa ou interna.

Nascimento et al. (2008) avaliaram, *in vitro*, por meio de cultura microbiana convencional a passagem do microrganismo *Fusobacterium nucleatum* através da interface entre implantes hexagonais externos e conectores protéticos fundidos ou pré-fabricados. Foram avaliados 10 conjuntos para cada tipo de conector. Ao final de 14 dias, somente um conjunto de cada grupo apresentou sinais da passagem do microrganismo através da interface implante-conector. Segundo os autores, o baixo índice de contaminação em ambos os grupos pode ter sido atribuído ao controlado processo de fundição e à boa adaptação entre a superfície do implante e componente protético.

Pautke et al. (2009) propuseram em seu estudo a fabricação de um conector protético a partir de uma liga metálica com efeito de memória, com o objetivo de diminuir os espaços entre os componentes e implantes evitando a passagem microbiana. O conector, com conexão hexagonal externa, foi desenhado usando uma liga metálica de nitinol com memória baseando-se em cálculos matemáticos, considerando a temperatura da liga possíveis modificações reversíveis em sua estrutura cristalina. Os protótipos dos conectores foram testados quanto à sua suscetibilidade a penetração de microrganismos *in vitro*, em condições estáticas e dinâmicas. Para o grupo controle foram usados conectores semelhantes, mas fabricados com ligas convencionais. Os conjuntos foram imersos em soluções bacterianas por 1 semana e a contaminação no interior dos implantes foi avaliada por meio de cultura convencional. A análise microbiológica não revelou nenhuma penetração do microrganismo *Escherichia coli* em

condições estáticas, quer no grupo controle ou de protótipos. Em condições dinâmicas, no entanto, os protótipos mostraram uma redução significativa de infiltração bacteriana em comparação com os controles. Os autores concluíram que os conectores desenvolvidos usando uma liga com memória mostraram uma redução significativa de infiltração bacteriana quando comparado aos conectores convencionais, e esta melhora pode minimizar os problemas clínicos, tais como peri-implantite e, conseqüentemente, aumentar o sucesso em longo prazo dos implantes dentários.

Aloise et al. (2010) determinaram e compararam a frequência de infiltração bacteriana do *Streptococcus sanguinis* biótipo II por meio da interface implante-conector protético entre os dois sistemas de implantes com conexão do tipo cone morse. Dois diferentes métodos de ativação dos conectores cônicos foram utilizados: Tapped-in (Bicon) e Screwed-in (Ankylos). Vinte conjuntos implantes-conectores foram usados, 10 Bicon e 10 Ankylos. A parte interna de cada um dos 20 implantes foi previamente inoculada com 0,1 mL de uma solução contendo o microrganismo *S. sanguinis II* (ATCC 10557). Os componentes foram, então, adaptados aos implantes conforme especificações dos fabricantes. Em seguida, foram totalmente imersos individualmente em tubos de ensaios contendo uma solução estéril de nutrientes (BHI). Os conjuntos foram incubados em condições anaeróbicas a 37°C por 14 dias. Os tubos foram monitorados diariamente para a ocorrência de turvação do meio de cultura em decorrência da infiltração microbiana através da interface dos conjuntos. Dois tubos contendo os conjuntos implantes-conectores, 2 de cada grupo, apresentaram turvação do meio de

cultura, indicando a existência de crescimento bacteriano dentro dos implantes após 48 horas de incubação. A passagem dos microrganismos através da interface foi confirmada pelo teste de cultura microbiana para a presença de *Streptococcus sp.* Nenhum dos tubos controles usados para avaliação da possível contaminação externa dos conjuntos foram contaminados. A frequência de infiltração bacteriana na interface implante-conector, com os dois diferentes sistemas de implantes cone morse, foi de 20% para cada sistema. Não houve diferença significativa entre eles. Os autores concluíram que, independentemente de qual dos dois sistemas de conexão do tipo cone morse usados, Tapped-in (Bicon) ou Screwed-in (Ankylos), este estudo *in vitro* mostrou a passagem bacteriana por meio da interface implante-conector protético.

2. 4 Técnicas moleculares de diagnóstico microbiológico

Estudos encontrados na literatura têm demonstrado que diversos microrganismos presentes na cavidade oral, em especial os relacionados à doença periodontal, são responsáveis pelos maiores índices de insucesso dos implantes, além de fatores oclusais desfavoráveis (ONG et al. 1992; SBORDONE et al., 1995). A presença de bactérias periodonto-patogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com periodontite próximos aos implantes dentais são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes (GOUVOUSSIS et al., 1997; SAITO et al., 1997).

Técnicas moleculares de diagnóstico foram desenvolvidas durante as duas últimas décadas e têm sido extensivamente usadas na detecção e quantificação de espécies microbianas habitando a cavidade oral (SAKAMOTO et al. 2005; HAFFAJEE et al. 2009; COSTA et al. 2010). Estas técnicas são mais rápidas, sensíveis e específicas quando comparadas às técnicas convencionais de cultura microbiana, que podem falhar ao detectar e identificar várias espécies frequentemente presentes na cavidade oral, microrganismos muitas vezes incultiváveis ou fastidiosos (ROLPH et al. 2001; BARBOSA et al. 2009; ROÇAS et al. 2010). Os métodos moleculares permitem uma identificação mais precisa das espécies bacterianas que apresentam um comportamento fenotipicamente divergente e não são dependentes da viabilidade celular, o que representa uma grande vantagem em estudos avaliando infecções anaeróbicas, onde a morte celular pode ocorrer durante a coleta ou transporte das amostras (WHELEN; PERSING 1996; PITT; SAUNDERS, 2000). Estas técnicas têm revelado uma enorme variação na microbiota presente em diversas regiões do corpo humano (ECKBURG et al. 2005; DETHLEFSEN et al. 2007; GRICE et al. 2008; OAKLEY et al. 2008). Estes estudos revelaram uma grande quantidade de espécies bacterianas ainda não cultiváveis e que podem estar ou não associadas a processos infecciosos (TURNBAUGH et al. 2007; MULLARD 2008).

Recentemente, o sequenciamento do gene 16S DNA ribossômico (rDNA), presente no genoma bacteriano, tem sido largamente usado para avaliar a diversidade microbiana da boca (GU et al. 2009), esôfago (MACFARLANE et al. 2007), estômago (LI et al. 2009), intestino (HILL et al. 2010), colon (MÄKIVUOKKO

et al. 2010) e vagina (OAKLEY et al. 2008). Esta técnica não permite a quantificação das espécies encontradas, mas possibilitam a detecção de uma vasta população de espécies ainda não-cultiváveis e muitas vezes associadas com a condição de doença.

A técnica de hibridização DNA Checkerboard (SOCRANSKY et al. 1994) utiliza sondas feitas a partir de DNA genômico, e apresenta como principal vantagem a identificação e quantificação de várias espécies bacterianas em um grande número de amostras da cavidade oral simultaneamente, e é particularmente aplicável em estudos epidemiológicos. Esta técnica tem sido aplicada recentemente em diversas áreas da odontologia para avaliar a composição do biofilme bacteriano em condições de saúde ou doença (ABERG et al. 2009, TELES et al. 2010, KIM et al. 2010, VETTORE et al. 2010), e na condução de estudos sobre a associação entre o biofilme bacteriano e fatores locais e sistêmicos (BORGES et al. 2009, DEMMER et al. 2010). A técnica também é usada para avaliar a microbiota associada com lesões endodônticas (ROÇAS; SIQUEIRA 2010), na mudança de composição do biofilme como resultado do tratamento de terapias periodontais (HAFFAJEE et al. 2009).

Ao longo da última década, estudos de acompanhamento clínico foram realizados para avaliar a composição da microbiota presente em pacientes reabilitados com implantes osseointegráveis. Quirynen et al. (2005), estudaram a composição microbiológica através da técnica de hibridização *DNA-Checkerboard* em pacientes submetidos à tratamento com implantes (Branemark System, Nobelbiocare) mandibulares após 10 anos de função. Trinta e sete pacientes

desdentados totais com média de idade variando dos 36 aos 85 anos, foram divididos em dois grupos: (1) 25 pacientes reabilitados com próteses tipo *overdenture* (OD) e, (2) 12 pacientes portadores de prótese fixas sobre os implantes (FFP). As amostras das placas subgengivais foram coletadas com o auxílio de cones de papel estéreis. Após os 10 anos de função das próteses não foram observadas diferenças estatísticas quanto à composição das placas subgengivais entre os grupos estudados (OD e FFP). A microbiota subgengival dos implantes apresentou baixas quantidades de DNA ($\pm 10 \times 10^5$), mas grande frequência de detecção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (>90%), *Porphyromonas gingivalis* (>85%) e *Tannerella forsythensis* (30%).

Dahlèn e Leonhardt (2006) avaliaram através da técnica do *DNA-Checkerboard*, a associação de 13 novas bactérias periodontopatogênicas, com 12 patógenos periodontais consagrados. Amostras de sítios saudáveis e com doença periodontal foram coletadas de 50 pacientes com cones de papel absorventes. Essas amostras foram testadas contra 25 sondas genômicas das espécies a serem avaliadas. Os autores observaram que, das 25 espécies estudadas, 24 foram detectadas mais frequentemente nos sítios com doença periodontal que em sítios saudáveis. Das novas espécies associadas às doenças periodontais, apenas *Prevotella tannerae*, *Filifactor alocis* e *Porphyromonas endodontalis* apresentaram diferenças estatísticas em relação aos sítios saudáveis e com doença periodontal. Os autores concluíram que estes microrganismos devem ser considerados em conjunto com as 12 espécies já consagradas no diagnóstico da periodontite associada à microbiota bacteriana.

Mais recentemente, a técnica vem sendo utilizada em estudos clínicos e laboratoriais para a identificação e quantificação de espécies bacterianas provenientes do interior de implantes osseointegráveis. Callan et al. (2005) investigaram por meio de sondas de DNA as bactérias periodontopatogênicas que podem habitar as superfícies internas e componentes protéticos dos implantes. Foram avaliadas amostras provenientes de 54 implantes em 32 pacientes, sendo 24 da região maxilar e 30 da mandíbula. Após 5 meses da colocação dos implantes, com o auxílio de cones de papel esterilizados, os autores coletaram amostras do interior de 43 implantes e das roscas dos parafusos dos conectores cicatrização de 11 implantes. Foram confeccionadas sondas de DNA genômico para detectar as seguintes espécies bacterianas: *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. Todas as amostras coletadas a partir dos parafusos de cicatrização apresentaram resultado negativo para todas as espécies avaliadas. Moderados a altos níveis de 8 espécies potencialmente patogênicas foram encontradas habitando a superfície interna dos implantes. A porcentagem total de resultados positivos para estas espécies foi: 41,9% *A. actinomycetemcomitans*, 60,5% *T. forsythensis* e 44,2% *C. rectus*, 60,5% *E. corrodens*, 48,8% *F. nucleatum*, 46,5% *P. gingivalis*, 55,8% *P. intermedia* e 51,2% *T. denticola*. Não foram observadas diferenças significantes para as colonizações obtidas quando foram comparadas as regiões de localização dos implantes, maxila ou mandíbula. As espécies foram encontradas colonizando os implantes no

prazo de 25 dias após a cirurgia de reabertura e posicionamento do conector de cicatrização. Segundo os autores, estes resultados parecem apoiar investigações prévias demonstrando a translocação de bactérias da dentição residual para os implantes.

Nascimento et al. (2009) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a viabilidade do método de hibridização DNA Checkerboard na detecção e quantificação de espécies bacterianas provenientes das partes internas dos implantes, e comparar a infiltração bacteriana através da interface entre implantes e conectores totalmente calcináveis ou calcináveis com a plataforma protética pré-fabricada. Nove conectores totalmente plásticos e outros 9 conectores plásticos com a plataforma protética pré-fabricada em Co-Cr foram fundidos em uma liga de Ni-Cr. Um terceiro grupo com nove implantes foi utilizado como controle positivo para a contaminação. O interior dos implantes foi inoculado com 3 μ L de uma solução contendo 10^8 células/mL de *Streptococcus sobrinus*. As amostras bacterianas foram imediatamente coletadas dos implantes do grupo controle, enquanto que os componentes fundidos dos grupos 1 e 2 foram unidos aos implantes de duas partes com conexão hexagonal externa. Após a união, os conjuntos foram completamente imersos em 5 mL de caldo Tripty Soy Broth (TSB) esterilizado. Após 14 dias de incubação em condições de anaerobiose, a passagem de microrganismos através da interface implante-conector foi avaliada por meio da contaminação do meio TSB. A contaminação interna dos implantes foi avaliada com o método de hibridização DNA Checkerboard. O método de detecção proposto foi suficientemente sensível para detectar e quantificar os microrganismos recolhidos das partes internas dos implantes. Não houve

diferença significativa em relação à infiltração bacteriana e contaminação interna dos implantes em ambos os conectores avaliados. As contagens bacterianas no grupo controle foram significativamente do que nos grupos experimentais. A frequência de infiltração bacteriana através da interface não apresentou diferença significativa quando conectores fundidos ou pré-fabricados foram usados. Os autores concluíram que a técnica de hibridização DNA Checkerboard constitui um método adequado para a avaliação de contaminação interna de implantes dentários, embora estudos adicionais são necessários para validar a precisão do método.

Barbosa et al. (2009) compararam, *in vitro*, a infiltração bacteriana na interface entre implante-conector protético pela cultura microbiana convencional e o método de diagnóstico molecular DNA Checkerboard. Vinte implantes Branemark-compatíveis com um diâmetro de 3,75 mm e uma plataforma de hexágono externo foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 10 conjuntos implantes-conectores. Um grupo foi utilizado para analisar a contagem bacteriana no interior dos implantes pela hibridização DNA Checkerboard e o outro pela cultura convencional. Quantidades definidas de *Fusobacterium nucleatum* (3 µL, correspondentes a 10⁸ ufc/mL) foram inoculadas no interior dos implantes de ambos os grupos. Após a inoculação, os componentes protéticos dos implantes foram adaptados com um torque de 32 Ncm. Os conjuntos implantes-conectores dos 2 grupos foram colocados individualmente em tubos contendo meio de cultura CaSaB esterilizado e incubados em condição de micro-aerofilia a 35°C por 14 dias. Os tubos foram observados diariamente quanto à turvação do meio, indicativo da passagem do microrganismo do interior dos implantes para o meio

externo. Após o sinal de contaminação do meio, nos casos de turvação, ou ao final dos 14 dias de experimento, o conteúdo do interior dos implantes foi coletado com escovas do tipo *microbrush* e analisado pelos métodos propostos. Seis tubos com os conjuntos implantes-conectores apresentaram turvação do meio, sinal indicativo da passagem do microrganismo pela interface. Ambos os métodos utilizados para quantificação mostraram reduzidas contagens de microrganismos recolhidos a partir do interior dos implantes. No entanto, o número de contagens de *F. nucleatum* foi maior pelo método DNA Checkerboard quando comparado com o grupo analisado por cultura convencional. Ao final da investigação, os autores concluíram que o método DNA Checkerboard mostrou-se mais sensível do que a cultura microbiana convencional na detecção dos microrganismos.

Neste recente estudo, Cosyn et al. (2009), compararam a composição microbiana dos sulcos peri-implantares e componentes internos dos implantes, sem sinais clínicos de peri-implantite e em função por vários anos. Utilizaram a técnica de hibridização DNA Checkerboard para identificar e quantificar 40 espécies bacterianas distintas. Cinquenta e oito implantes de titânio com conexão hexagonal externa (Branemark Implants) de oito pacientes sistemicamente saudáveis (sete mulheres e um homem) foram envolvidos no estudo. Todos os implantes estavam localizados na maxila e haviam sido carregados com próteses parafusadas há pelo menos 10 anos. Amostras de fluido gengival foram coletadas dos sulcos peri-implantares. Todas as restaurações foram removidas, e amostras de biofilme bacteriano das roscas dos parafusos de fixação dos conectores protéticos foram coletadas com o auxílio de bolinhas de algodão completando as amostras para a análise microbiológica. A frequência e nível de detecção

bacteriana foi muito semelhante para as amostras dos sulcos peri-implantares quando comparadas as amostras do interior das próteses. No entanto, não houve correlação microbiana entre os diferentes sítios. Comparando-se as amostras provenientes dos parafusos de fixação das próteses com as dos sulcos peri-implantares, a maioria das espécies avaliadas foram menos freqüentes e em menor número no primeiro grupo. Apesar da ausência de sinais clínicos de peri-implantite nos implantes envolvidos neste estudo, a alta prevalência de espécies associadas com a patologia foi significativa. Os autores alertam para o alto índice de contaminação encontrado nas partes internas dos componentes protéticos, e sugerem que os espaços resultantes da pobre adaptação entre os componentes dos implantes de duas partes podem ter sido o principal caminho para a infiltração bacteriana. Os autores concluíram que a contaminação dos parafusos de fixação dos conectores protéticos provavelmente teve origem no sulco peri-implantar seguindo pelas interfaces implante-conector e conector-prótese.

A extensa literatura sugerindo a passagem de bactérias pela interface entre implantes e conectores protéticos como conseqüência do afrouxamento do parafuso de fixação dos conectores protéticos levou Nascimento et al. (2009) a investigarem a influência da repetição do apertamento dos parafusos sobre a infiltração do microrganismo *Streptococcus mutans* através da interface entre implantes e conectores pré-fabricados. Vinte conectores calcináveis e com a plataforma protética hexagonal externa pré-fabricada em Cr-Co foram divididos em 2 grupos iguais. Os parafusos dos conectores foram apertados a 32 Ncm no grupo 1 (n = 10, controle) e apertados a 32 Ncm, desapertados e re-apertados com o mesmo torque por duas vezes no grupo 2 (n = 10). Após as uniões, os conjuntos

foram individualmente imersos em tubos contendo 5 mL de caldo TSBY inoculado com *S. mutans*, e incubados em condições de micro-aerofilia por 14 dias. Após o período de incubação, a possível contaminação do interior dos implantes foi avaliada pelo método de hibridização DNA Checkerboard. Foram encontrados microrganismos abrigando a superfície interna dos implantes dos dois grupos avaliados. No entanto, as contagens bacterianas no grupo onde os parafusos foram re-apertados foram significativamente maiores do que no grupo controle. Esses resultados indicam que a infiltração bacteriana entre os implantes e conectores ocorre mesmo sem ação de carga sobre os conjuntos, e a passagem de microrganismos é maior quando o parafuso do conector sobre tensões repetidas.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo, *in vitro*, foram:

- avaliar, por meio da técnica de hibridização DNA Checkerboard, a passagem de bactérias presentes na saliva humana para o interior dos implantes através da interface implante-conector protético sob aplicação de carga cíclica controlada e na ausência de carga;

- comparar a quantidade de microrganismos recolhidos do interior dos implantes com conexão do tipo hexágono externo, hexágono interno e cone morse.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1 Ensaio de simulação de carga sobre os implantes

Seleção dos implantes

Para o presente estudo, foram utilizados 60 implantes odontológicos de titânio com 10 mm de altura cada (SIN[®] - Sistema de Implante Nacional, São Paulo, Brasil), dos quais 20 apresentavam conexão do tipo hexágono externo (SUR 3710 - Implant Revolution, 3,75 mm Ø, Lote G40368), 20 conexão do tipo hexágono interno (SIHS 4510 - Implant Strong, 4,5 mm Ø, Lote G40362) e 20 conexão do tipo cone morse (SCM 3810 - Implant Revolution Morse, 3,8 mm Ø, Lote F90075). Para a avaliação da passagem bacteriana, foram constituídos corpos de prova compostos pelos implantes e seus respectivos conectores protéticos. Foram selecionados para a composição dos conjuntos, conectores protéticos cônicos de titânio com 2 mm de altura (SIN[®] - Sistema de Implante Nacional), 20 com a plataforma protética em hexágono externo (AC 4102, 4,1 mm Ø, Lote G10020), 20 em hexágono interno (AC4502, 4,5 mm Ø, Lote F80222) e 20 em cone morse (ACM 4802, 4,8 mm Ø, Lote F80593). Nas Figuras 1 e 2 estão representados os implantes e conectores utilizados.

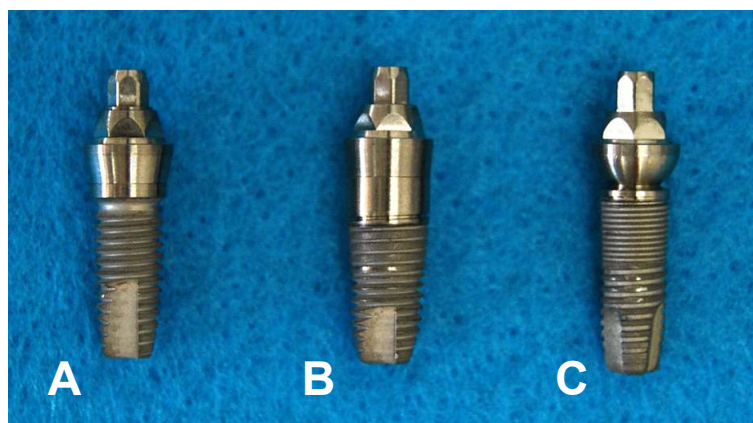


Figura 1 – Implantes com seus respectivos conectores protéticos unidos: A) Hexágono externo; B) Hexágono interno e C) Cone morse.

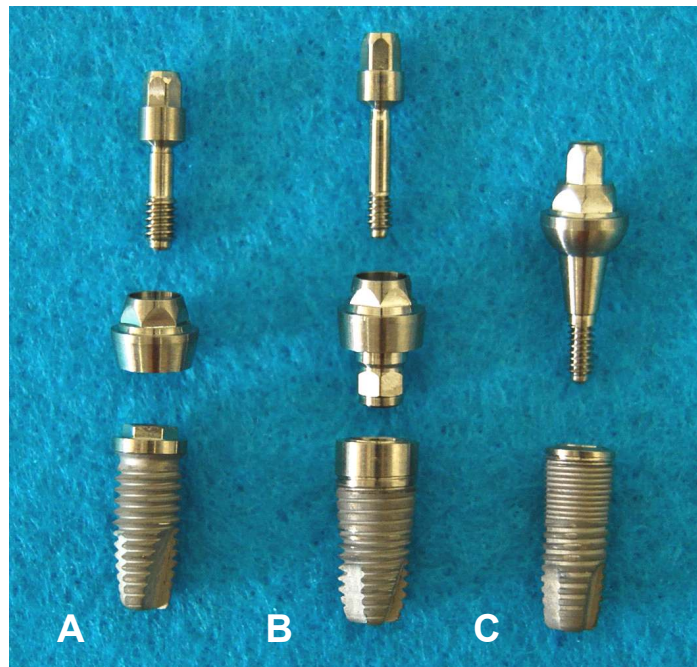


Figura 2 – Implantes e seus respectivos conectores protéticos: A) Hexágono externo; B) Hexágono interno e C) Cone morse.

Os implantes e conectores foram recebidos do fabricante em embalagens esterilizadas, assim como são disponibilizados comercialmente (Figura 3).



Figura 3 – Implantes em suas embalagens disponibilizadas no mercado.

Na Figura 4 estão representados os 3 tipos de plataforma de conexão dos implantes selecionados para o estudo.

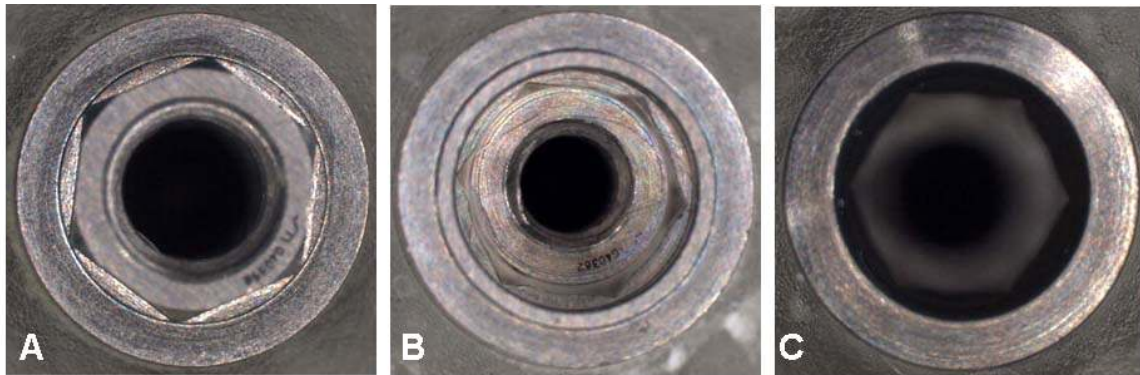


Figura 4 – Vista superior dos 3 tipos de conexões utilizadas: A) Hexágono externo; B) Hexágono interno e C) Cone morse.

Para o enceramento das coroas metálicas unitárias dos grupos que foram submetidos à ciclagem de carga, foram utilizados 30 cilindros protéticos calcináveis com hexágono externo e com a plataforma protética pré-fabricada em Cr-Co (CALE 06, SIN[®] - Sistema de Implante Nacional, Lote F10880 – Figura 5).

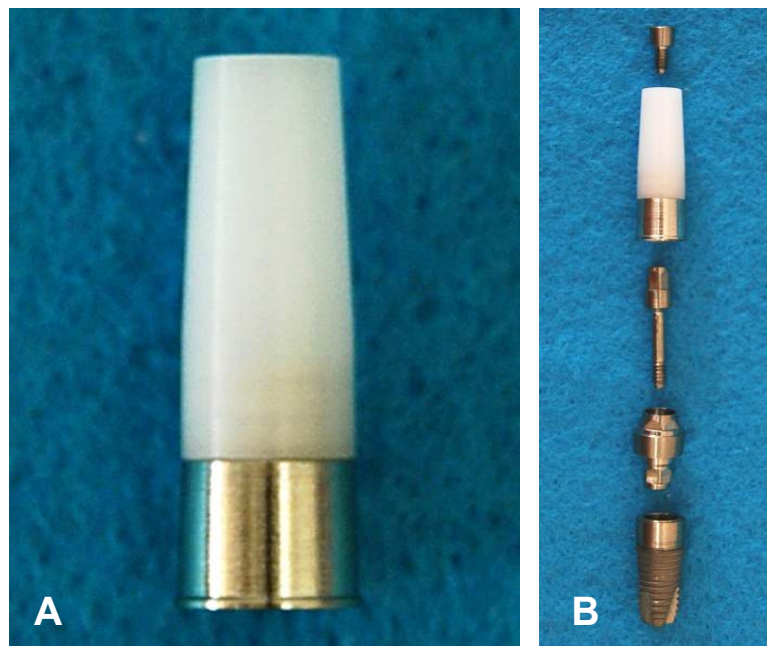


Figura 5 – A: Cilindro protético usado para enceramento das coroas metálicas; B: Esquema de montagens dos componentes protéticos ao implante de hexágono interno

Foram selecionados 30 parafusos de titânio para fixação das coroas sobre os conectores protéticos (PRH 30, 3 mm de comprimento, Lote G40389). Para a realização do estudo, os implantes e componentes protéticos foram divididos em grupos de acordo com o tipo de conexão, da seguinte forma: Grupo 1 - 20 conjuntos implante Hexágono Externo (HE)/Conector protético; Grupo 2 - 20 conjuntos implante Hexágono Interno (HI)/Conector protético; e Grupo 3 - 20 conjuntos implante Cone Morse (CM)/conector protético. Cada grupo foi subdividido em 2 grupos de 10 conjuntos cada, um Controle onde a contaminação bacteriana foi avaliada em condição estática, e outro grupo submetido à ciclos de carga.

Obtenção da base para enceramento das coroas protéticas e teste piloto de carga

Foi confeccionada uma matriz metálica para a realização do enceramento das coroas protéticas (Figura 6). A mesma matriz foi projetada para ser usada no teste piloto de contaminação dos implantes. Foram feitos orifícios com o mesmo diâmetro dos implantes estudados, e a estabilização final dos implantes foi feita por meio de parafusos de contenção localizados na lateral da matriz. A matriz foi utilizada para posicionar igualmente todos os cilindros protéticos sobre os implantes e seus conectores, obtendo-se um enceramento padronizado das coroas protéticas para os 3 grupos. Separadamente, um implante de cada tipo de conexão, idêntico aos utilizados no estudo, foi parafusado sobre a matriz metálica, e sobre o mesmo foi adaptado o seu respectivo conector protético com o auxílio

de chaves manuais. Por fim, sobre cada conjunto implante-conector montado sobre a matriz, foram posicionados, um a um, os cilindros protéticos para o enceramento das coroas (Figura 7).

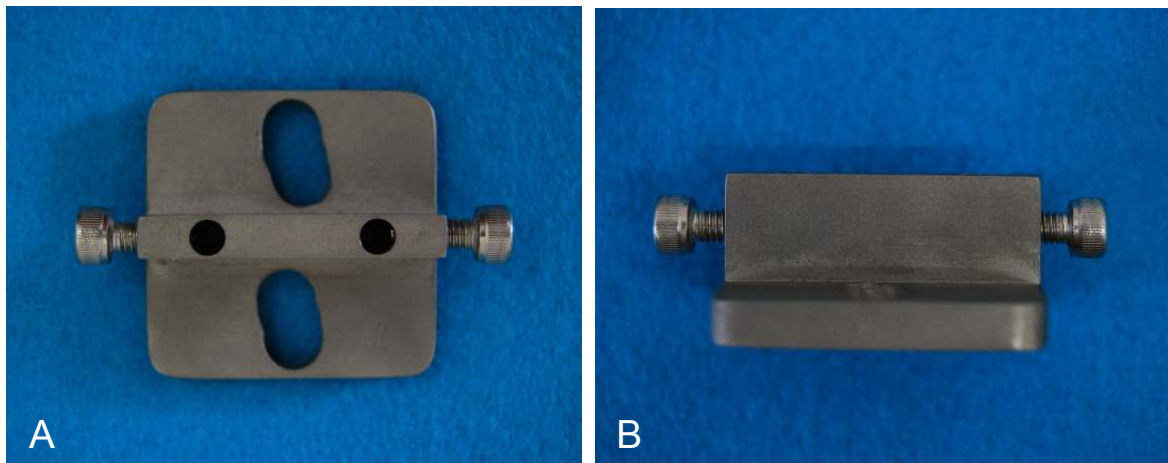


Figura 6 – A: Vista superior da matriz metálica mostrando os dois orifícios para o posicionamento dos implantes; B: Vista lateral mostrando os parafusos de fixação lateral dos implantes.

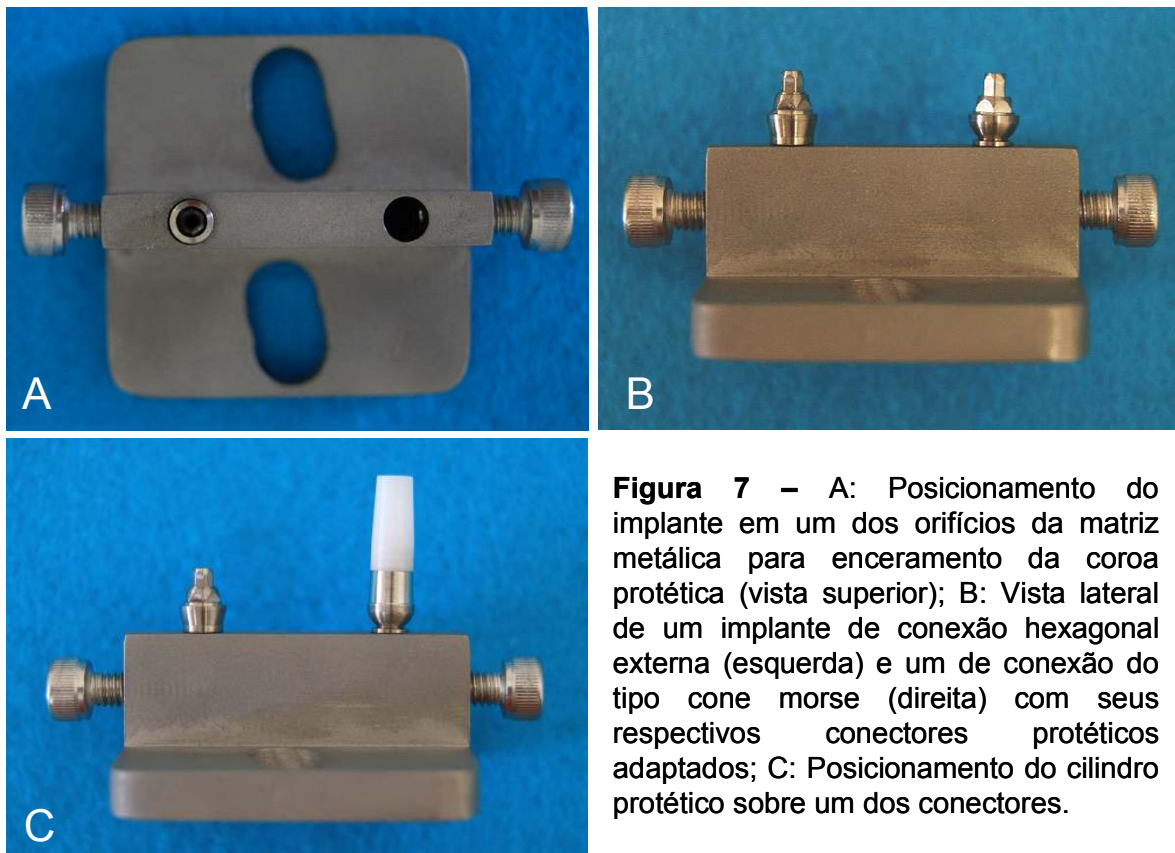


Figura 7 – A: Posicionamento do implante em um dos orifícios da matriz metálica para enceramento da coroa protética (vista superior); B: Vista lateral de um implante de conexão hexagonal externa (esquerda) e um de conexão do tipo cone morse (direita) com seus respectivos conectores protéticos adaptados; C: Posicionamento do cilindro protético sobre um dos conectores.

Enceramento das coroas protéticas

Sobre os cilindros protéticos já adaptados aos conjuntos implantes-conectores fixados a matriz metálica, foram enceradas as 30 coroas unitárias simulando a anatomia do primeiro molar permanente inferior (altura de 0,8 cm, largura méso-distal de 1 cm e largura labial-lingual de 0,6 cm). Além de simular a reabilitação de um elemento dentário posterior, as coroas foram confeccionadas nestas dimensões para proporcionar uma superfície adequada para a aplicação da carga cíclica durante o teste de contaminação. Para servir como padrão aos demais enceramentos, uma primeira coroa fixa parafusada sobre o conector protético dos implantes foi encerada, a qual possibilitou a confecção das demais coroas protéticas com as mesmas dimensões (Figura 8).



Figura 8 – Coroa padrão encerada sobre o cilindro protético

Para o enceramento da cora, foi usada uma cera para enceramento de incrustações (Kota Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil). Foram criados 2 canais auxiliares sobre a cora encerada, um na região superior para o despejamento da cera plastificada, e outro na região lateral para facilitar o escoamento da cera durante o procedimento de enceramento. Com o conjunto todo posicionado sobre a matriz metálica (implante - conector - cora encerada), foi realizado um alívio em cera 7 sobre o enceramento e canais de alimentação para criar o espaço necessário para o material de moldagem (Figura 9).

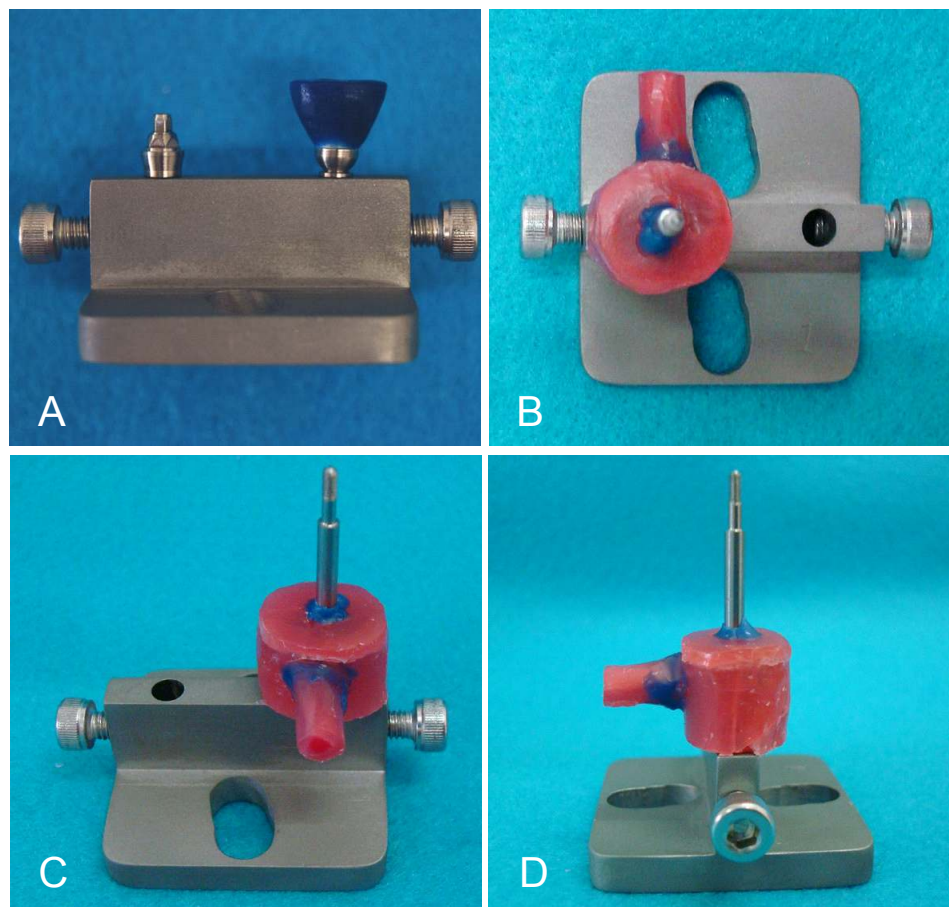


Figura 9 – A: Coroa encerada posicionada na matriz metálica sobre o implante; Confeção dos canais de alimentação e alívio em cera para o enceramento, vista superior (B), frontal (C) e lateral (D).

Primeiramente foi confeccionada uma matriz com a pasta pesada da silicona de condensação (Zetaplus+Indurent Gel, Zhermack, Badia Polenise, RO, Itália) sobre os componentes e matriz metálica, servindo como uma moldeira para a moldagem final (precisa) com a pasta leve. Após a presa do material pesado, a matriz foi dividida ao meio com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O alívio em cera 7 foi removido seguindo-se com a moldagem final com a pasta leve da silicona (Oranwash L+Indurent Gel, Zhermack, Badia Polenise, RO, Itália). Após a moldagem final, a matriz em silicona foi mais uma vez dividida ao meio na mesma posição inicial, obtendo-se duas metades com as cópias negativas da coroa padrão encerada (Figura 10).

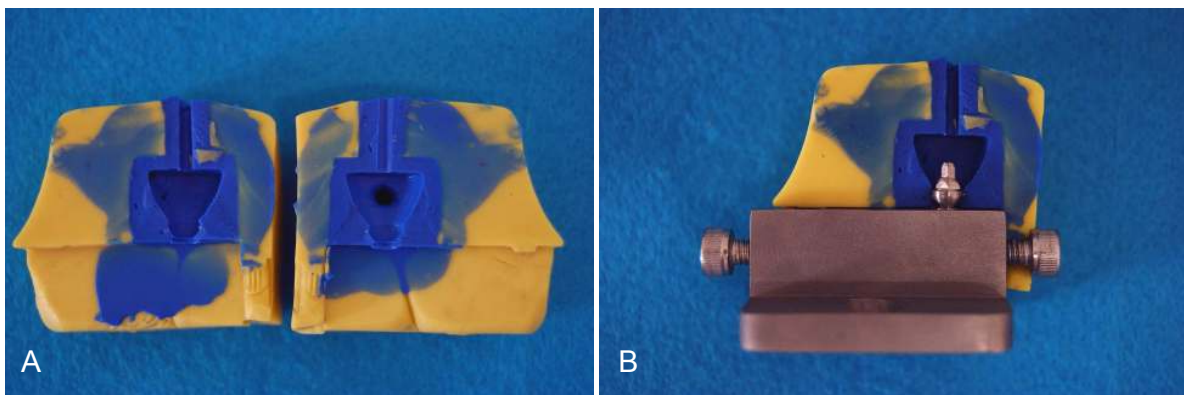


Figura 10 – A: Molde do sistema montado sobre a matriz metálica, obtido em silicona, para a o enceramento das coroas protéticas. Na imagem podem ser observados os canais de alimentação para injeção e escoamento da cera plastificada; B: Molde montado sobre a matriz metálica com o implante em posição.

Todos os demais cilindros protéticos tiveram sua porção calcinável cortada na mesma altura para facilitar o posicionamento da matriz de silicona sobre os conjuntos adaptados à matriz metálica. Após o posicionamento das duas partes da matriz em silicona, as coroas foram confeccionadas com o gotejamento da cera plastificada através do canal auxiliar superior (Figura 11).

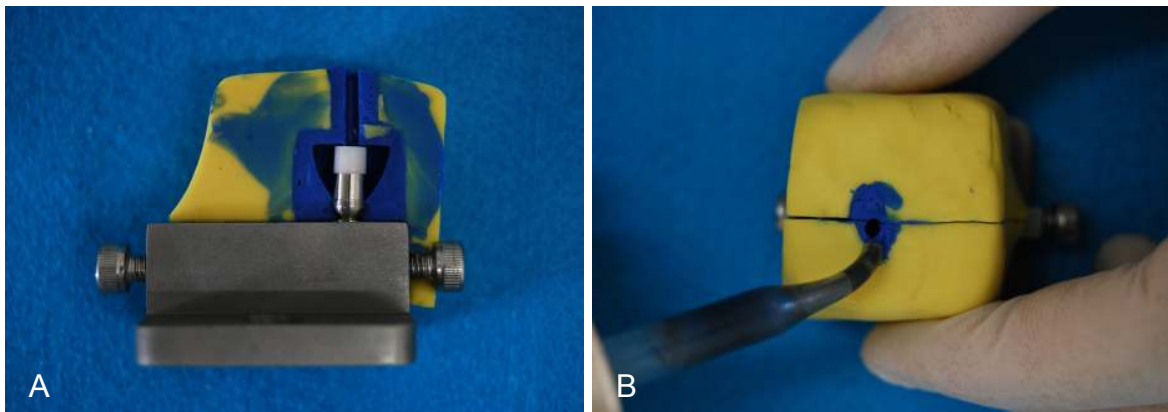


Figura 11 – A: Porção calcinável dos cilindros protéticos cortados para posicionamento no molde de enceramento; B: Adaptação do molde sobre a matriz e enceramento das coroas com a cera plastificada.

Para a plastificação da cera foi utilizado um plastificador de cera com regulação digital da temperatura de fusão da mesma (Hotty LED, Renfert GmbH, Hilzigen, Alemanha). Após o resfriamento da cera, as duas partes da moldeira eram separadas e o acabamento final das coroas feito com auxílio de uma espátula LeCron. As coroas enceradas permaneceram imersas em água destilada até o procedimento de inclusão e fundição (Figura 12).

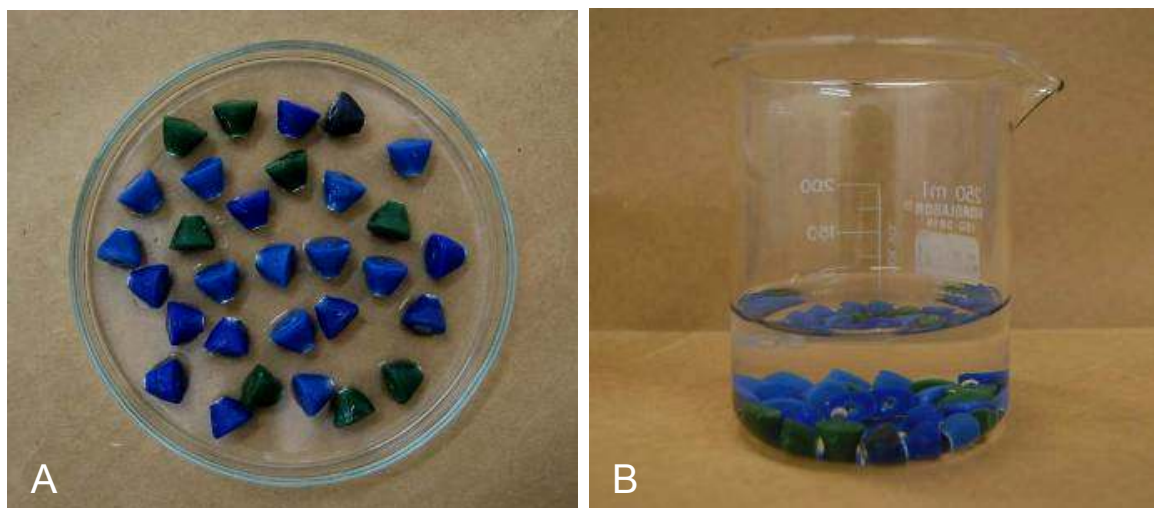


Figura 12 – A: 30 coroas protéticas enceradas; B: Coroas armazenadas em água destilada até o processo de inclusão e fundição.

Inclusão e fundição das coroas protéticas

Inclusão

Todas as coroas enceradas foram individualmente conectadas a canais de alimentação em cera (*sprues*), em sua porção lateral mais cervical (2 mm distante do colar metálico), para o procedimento de fundição. As coroas e *sprues* foram conectadas aos anéis de borracha para a inclusão nos anéis de fundição (Figura 13).

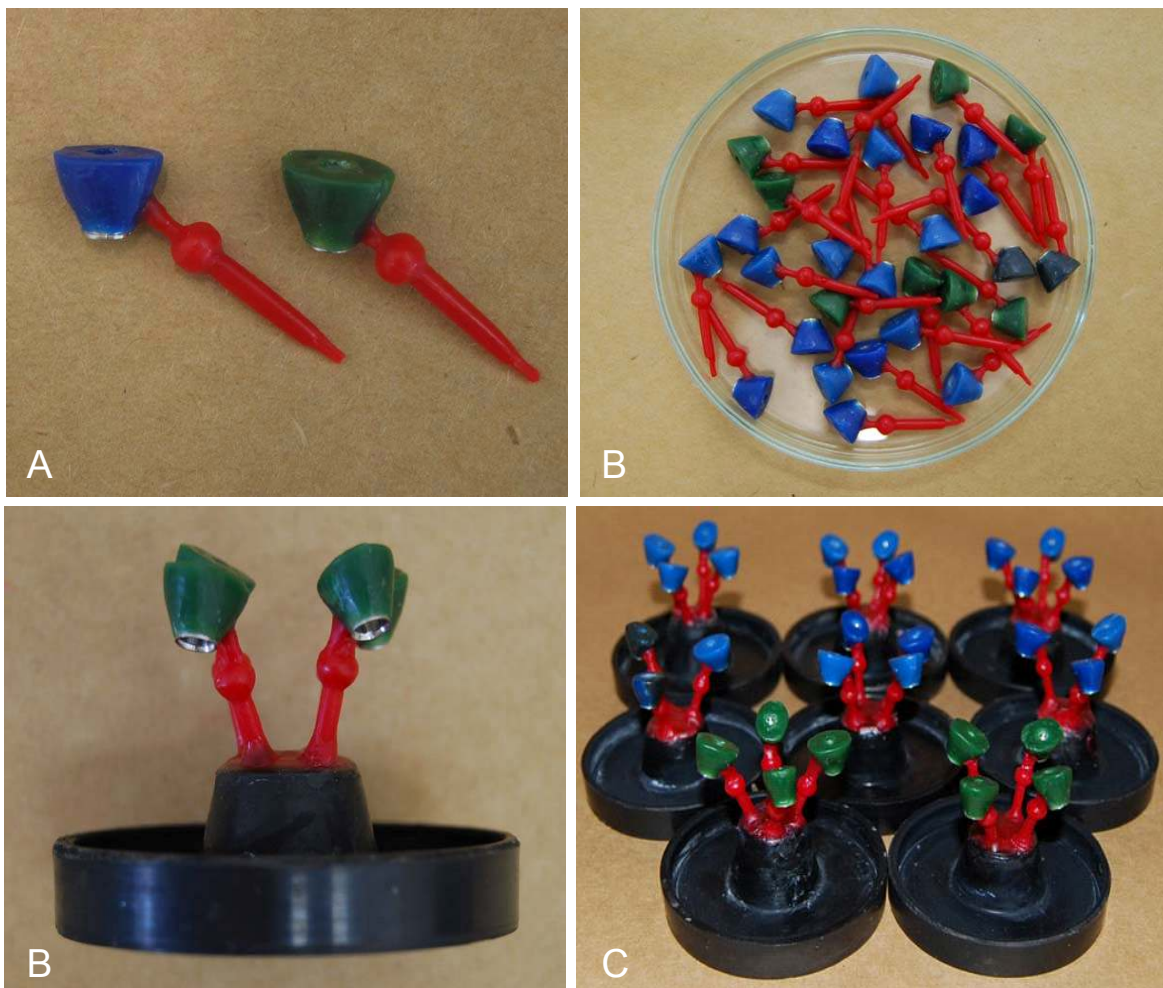


Figura 13 – A e B: *Sprues* adaptados à porção lateral e cervical das coroas; C e D: Coroas com os *sprues* posicionados nos anéis de borracha para o processo de inclusão e fundição.

Para a inclusão das coroas, foi utilizado um revestimento fosfatado, de ciclo rápido, Castorit Super C (Dentaurum, Ispringen, Alemanha, Lote 120631). O revestimento foi proporcionado segundo as especificações do fabricante. Inicialmente, o revestimento foi manipulado manualmente para a confecção da *boneca*. Uma pequena quantidade de revestimento foi aplicada com o auxílio de um pincel sobre as coroas e *sprues*, procurando desta forma cobrir e preencher todas as partes dos componentes evitando a formação de bolhas que prejudicassem o processo de fundição das peças (Figura 14). Por fim, para cada anel de fundição montado, uma quantidade do revestimento foi espatulada mecanicamente a vácuo por 60 segundos em espatulador elétrico (Turbomix - EDG Equipamentos e Controles Ltda, São Carlos, SP, Brasil). Ao final da espatulação, a massa foi vazada sob vibração até o preenchimento total do anel e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos.



Figura 14 – A e B: Confecção da *boneca* (inserção do revestimento sobre os enceramentos); C: Posicionamento das coroas no anel de fundição para preenchimento com o revestimento.

Fundição

As coroas foram fundidas em uma liga de Co-Cr especificamente formulada para esses sistemas (Kera 501, Lote P 03113, SIN[®]). As fundições foram realizadas na máquina de fundição Discovery Plasma (EDG Equipamentos e Controles Ltda., São Carlos, SP, Brasil) do Laboratório de Solda a Laser e Corrosão da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Esta máquina promove a fusão da liga com arco voltaico de corrente contínua através de um eletrodo de tungstênio, a vácuo, e sob atmosfera inerte de argônio, sobre cadinho de cobre. Essa máquina tem a unidade de fundição formada por duas câmaras ligadas entre si. A pastilha da liga fica posicionada sobre o cadinho de cobre da câmara superior e é fundida pela corrente elétrica gerada pelo arco voltaico. Depois de fundida, a liga é injetada no anel de fundição posicionado na câmara inferior por ação do vácuo gerado entre as duas câmaras da máquina de fundição, e da pressão de argônio aplicada sobre câmara superior. A Figura 15 ilustra os equipamentos usados no processo de fundição.



Figura 15 – A: Espatulador à vácuo; B: Forno para aquecimento do anéis de fundição; C: Máquina de fundição; D: Câmara de arco voltaico (superior) e câmara à vácuo (inferior) da máquina de fundição.

Como todas as coroas foram enceradas a partir do mesmo molde de silicona, a quantidade de cera usada para a confecção de cada coroa foi a mesma, correspondendo ao mesmo peso final para todas as amostras estudadas (0,8 g), padronizando desta forma a distorção causada pelo processo de fundição. Depois de fundidas, as coroas obtidas foram desincluídas e jateadas com óxido de alumínio (Polidental Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil), granulação de 100 μm , sob pressão de 80 lib/pol² (5,62 kgf/cm²) para a remoção do material de revestimento.

O ciclo térmico utilizado para o processo de fundição das coroas está representado no gráfico a seguir (Figura 16):

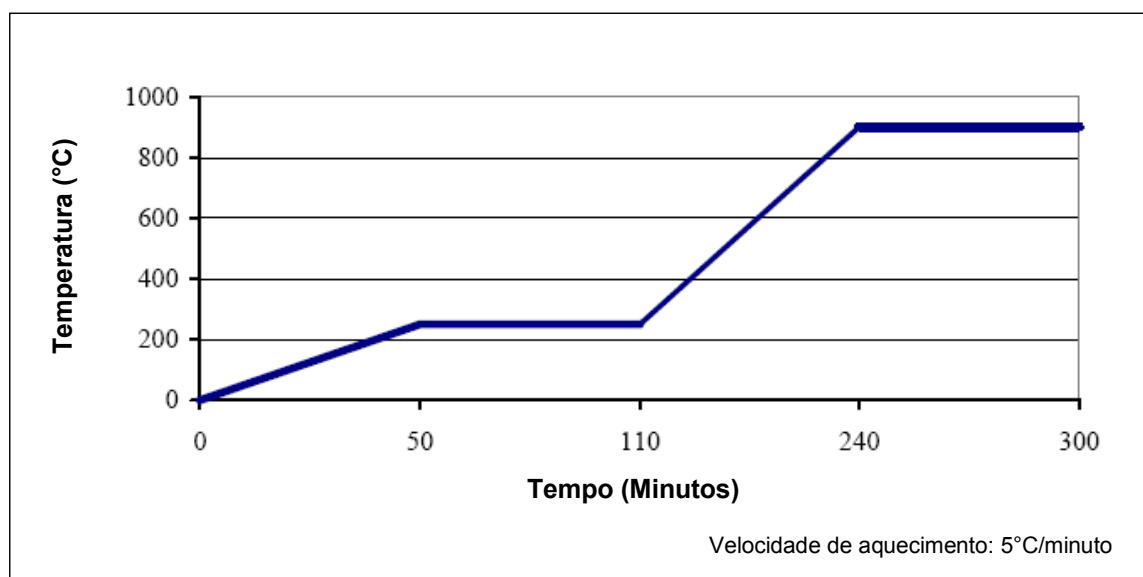


Figura 16 – Ciclo térmico de fundição dos corpos de prova.

Tratamento do metal (degaseificação)

Após o processo de fundição, foi feito o tratamento de superfície das peças fundidas. Para este procedimento as peças foram usinadas com pedra de óxido de

alumínio para remover nódulos e irregularidades e novamente jateadas com pó de óxido de alumínio ($100\mu\text{m}$) à pressão de 40 lib/pol² ($2,81\text{ kgf/cm}^2$). As peças foram, então, levadas a cuba ultra-sônica (Ultrasonic Cleaner, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para limpeza e remoção de impurezas onde permaneceram por 10 minutos em álcool isopropílico. O acabamento do metal foi essencial para garantir a lisura adequada das superfícies das coroas, minimizando a formação do biofilme bacteriano durante o teste de contaminação (Figura 17). Após o tratamento do metal, as 30 coroas fundidas foram dispostas individualmente em envelopes grau cirúrgico de polietileno e esterilizadas por plasma de peróxido de hidrogênio durante 60 minutos.

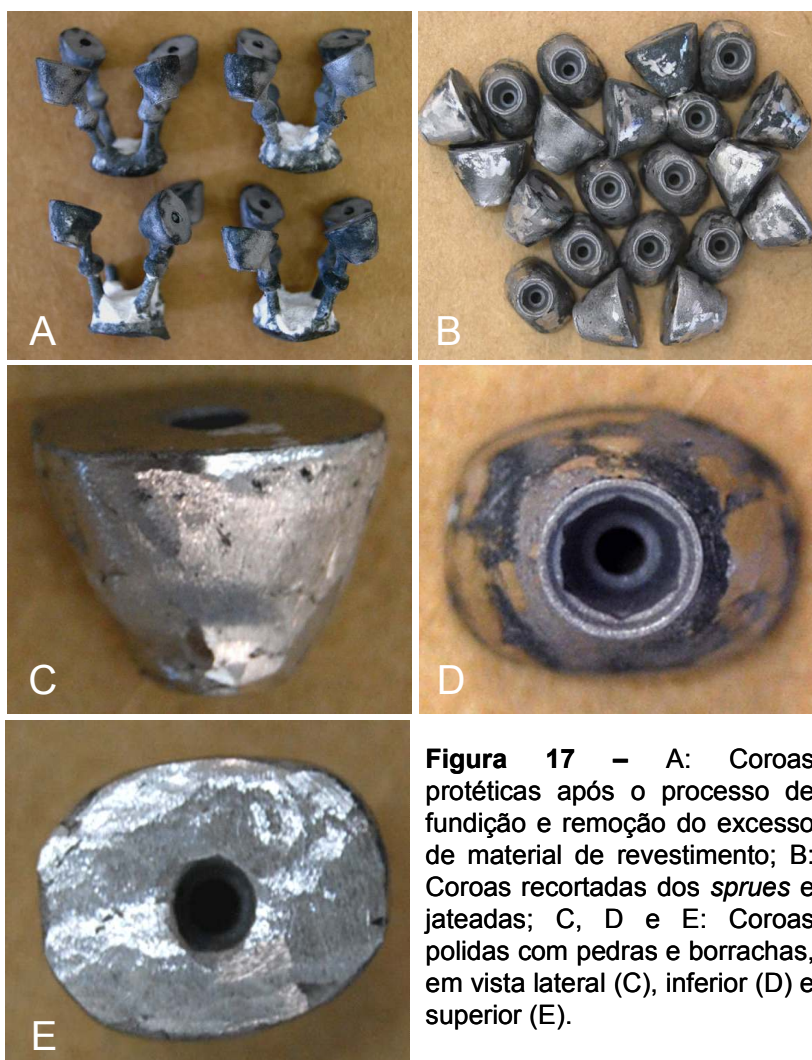


Figura 17 – A: Coroas protéticas após o processo de fundição e remoção do excesso de material de revestimento; B: Coroas recortadas dos *sprues* e jateadas; C, D e E: Coroas polidas com pedras e borrachas, em vista lateral (C), inferior (D) e superior (E).

Teste Piloto de contaminação dos implantes

Após a fundição das coroas metálicas, foi realizado um teste piloto com 4 implantes e 4 conectores protéticos iguais aos selecionados para o estudo, 2 com conexão hexagonal externa e 2 com conexão tipo cone morse. Este estudo piloto serviu para avaliar a viabilidade do estudo quanto à diluição da saliva humana e número de ciclos propostos para a realização do teste de contaminação. A mesma matriz metálica usada para o enceramento das coroas foi utilizada nesta etapa para a aplicação de carga sobre os conjuntos implantes-conectores. Após esterilização dos componentes protéticos e da matriz metálica, em condições assépticas e dentro de um fluxo laminar, os implantes foram adaptados à matriz e seus respectivos conectores e coroas foram parafusados com chaves manuais. Os conectores foram adaptados aos implantes com um torque final de 20 Ncm, enquanto que nas coroas metálicas o torque foi de 10 Ncm, de acordo com as recomendações do fabricante. A matriz metálica foi fixada por dois parafusos sobre a base de uma caixa confeccionada em acrílico (10 mm x 8 mm x 6 mm), dentro da qual foram colocados 50 mL de saliva humana diluída na proporção 1:200 (Figura 18). A saliva foi coletada de um indivíduo saudável. Os conjuntos implantes-conectores ficaram imersos apenas parcialmente, o suficiente para estabelecer o contato entre a saliva e a interface de conexão, e ao mesmo tempo evitar uma contaminação através da interface entre o parafuso de fixação oclusal e a coroa. Uma resistência foi colocada no interior da caixa para o controle da temperatura da saliva em 37°C. A caixa foi coberta com lâminas de cera e cola a base de cianoacrilato, permanecendo somente um orifício para a passagem do

dispositivo para a aplicação da carga. Todo o sistema foi adaptado por meio de parafusos em uma máquina de ensaio universal (EMIC MEN 2000) para a aplicação da carga cíclica. Um dispositivo foi desenvolvido para aplicar a carga sobre 2 implantes simultaneamente. Dois conjuntos implantes-conectores, um de cada tipo de conexão, foram submetidos a 3000 ciclos de carga com uma intensidade de 120N, em uma frequência de 70 ciclos por minuto. Outros 2 conjuntos, iguais aos primeiros, foram usados como controle, ou seja, foram testados sem a aplicação de carga. Ao final do teste, amostras da saliva usada no teste e amostras do interior dos 4 conjuntos foram coletadas e avaliadas quanto à presença de 12 espécies bacterianas.

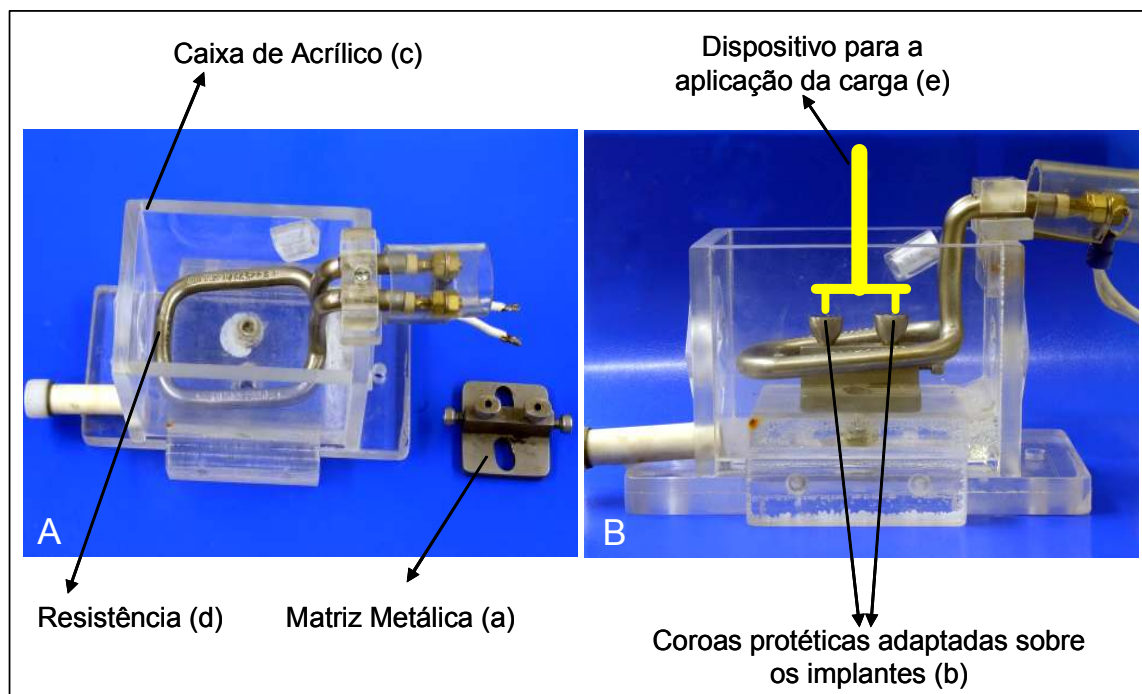


Figura 18 – A figura ilustra a matriz metálica e a caixa de acrílico utilizadas para a avaliação da passagem dos microrganismos através da interface implante-conector. (A) Matriz metálica e caixa de acrílico separadas; (B) Após união do conjunto para fixação na máquina de Ensaio Universal.

Obtenção da base dos corpos de prova

Todos os implantes foram embutidos em resina acrílica auto-polimerizável (VIPI, Pirassununga, SP, Brasil) para serem posteriormente submetidos à aplicação de carga. Um cano de PVC com 20 mm de diâmetro interno e 15 mm de altura foi usado como molde para constituir a base dos corpos de prova em resina acrílica. Os implantes foram incluídos de forma que a força aplicada durante o teste de contaminação incidisse a uma distância de 4 mm do longo eixo do implante, configurando desta forma uma força de ação lateral (excêntrica). Os implantes foram posicionados com suas plataformas protéticas posicionadas 2 mm acima da superfície de resina. Para que todos os implantes fossem incluídos exatamente na mesma posição no interior do cano de PVC, foi utilizado um paralelômetro com a base totalmente ajustável. O anel de PVC, com suas superfícies internas devidamente isoladas com vaselina líquida, foi posicionado sobre a base do paralelômetro na posição estabelecida. Os implantes foram removidos de suas embalagens, e um a um, foram conectados à haste móvel do paralelômetro sempre pelo mesmo conector protético já fixado, garantindo desta forma a mesma posição a todos os implantes. A resina, ainda em sua fase plástica, era vertida sobre o anel preenchendo-o totalmente para depois a haste com o implante fixado ser descida até sua posição final. A Figura 19 ilustra os materiais utilizados e a seqüência de embutimento dos implantes. Após a reação exotérmica de polimerização da resina, os corpos de prova foram removidos do interior do cano de PVC e suas superfícies foram regularizadas com lixas de granulação fina. Todos os corpos de prova de resina contendo os implantes foram

embalados em envelope grau cirúrgico de polietileno e esterilizados por plasma de peróxido de hidrogênio durante 60 minutos.

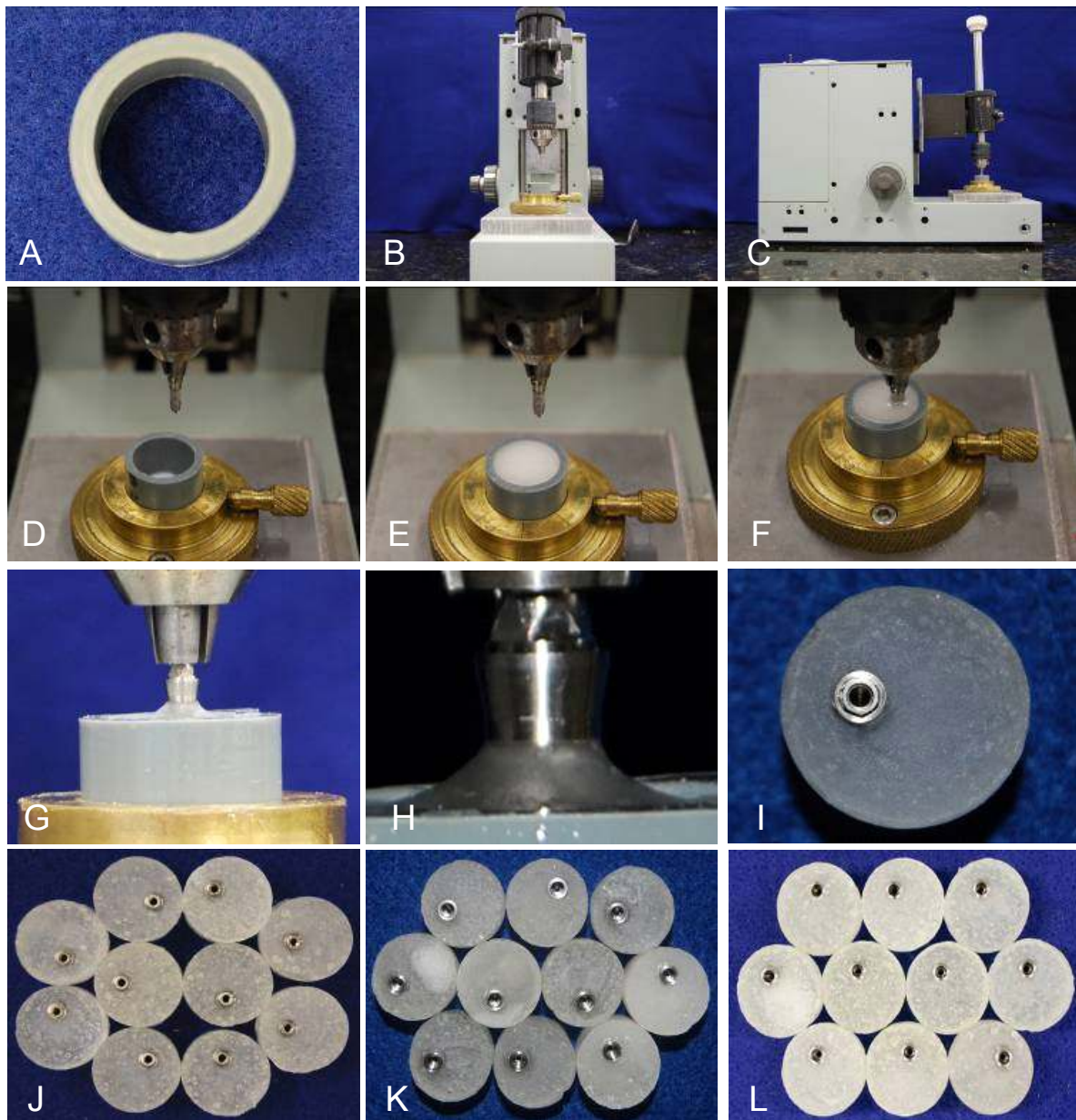


Figura 19 – A: Anel de PVC usado como matriz para a base de resina acrílica; B e C: Paralelômetro usado para a inserção dos implantes; D: Posicionamento do anel sobre a base móvel e do implante na haste móvel do paralelômetro; E: colocação da resina na fase plástica dentro do anel; F: Inserção do implante na posição determinada; G e H: Limite da junção implante-conector a 2 mm da base; I: Posicionamento do implante fora do centro da base para que a força aplicada sobre a coroa montada fique a 4 m do longo eixo; J, K e L: Implantes dos 3 grupos avaliados embutidos, HE (J), HI (K) e Cone Morse (L).

Obtenção da saliva

Foram coletadas amostras de saliva e biofilme supra-gengival de 5 indivíduos adultos saudáveis. Os participantes 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 durante o primeiro contato com os pesquisadores, e orientações foram dadas quanto aos procedimentos da pesquisa. O presente estudo foi realizado com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CAE 0028.0.138000-10). Na fase de recrutamento, foram incluídas pessoas de ambos os sexos, independente da faixa etária e que não apresentavam manifestações bucais de moléstias sistêmicas ou processos infecciosos agudos na cavidade oral. Procurou-se realizar as coletas sempre no mesmo horário, além de constituir um grupo de estudo com pessoas sob condições ambientais semelhantes, idades próximas, sob tipo de alimentação e cuidados semelhantes, a fim de se obter uma maior uniformidade da amostra de saliva, reduzindo com isso a variabilidade.

Todas as etapas micorbiológicas do estudo foram realizadas em ambiente asséptico, livre da contaminação externa, em um fluxo laminar e com bico de Bunsen. Inicialmente, a área interna do fluxo foi iluminada durante 30 minutos por luz ultra-violeta, após desinfecção por álcool 70. Toda a vidraria, pinças, torquímetro e chaves para torque foram previamente autoclavados. Os operadores foram devidamente paramentados com luvas cirúrgicas, gorros e máscaras esterilizadas. Foram coletados 2 mL de saliva não estimulada de indivíduo em

tubos de ensaio. Ao final das coletas, as amostras de saliva dos 5 indivíduos foram transferidas para um único tubo. Amostras do biofilme supra-gengival foram coletadas das faces lingual/palatina e labial dos primeiros molares superiores e inferiores de cada indivíduo com o auxílio de curetas e adicionadas aos 10 mL de saliva previamente coletados, procurando desta forma aumentar a concentração de microrganismos na saliva. Após as coletas, o tubo contendo a saliva e biofilme bacteriano dos 5 pacientes foi homogeneizado durante 3 minutos e armazenado em estufa bacteriológica a 37°C até o início do teste de contaminação dos implantes (Figura 20).

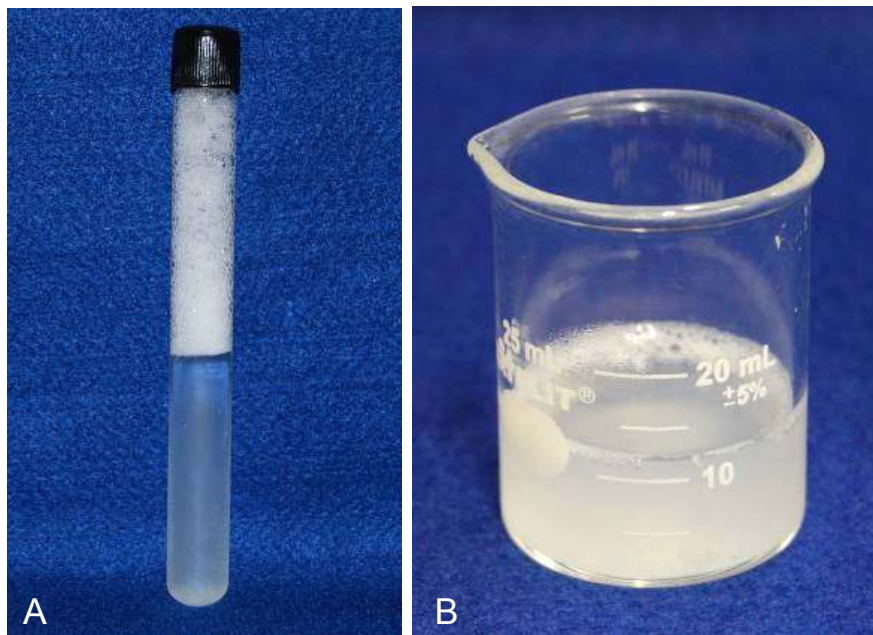


Figura 20 – A: Salivas coletadas para o estudo; B: Saliva após homogeneização e mistura do biofilme supra-gengival.

Montagem dos corpos de prova para a aplicação da carga cíclica

Os corpos de prova com os implantes foram retirados das embalagens de esterilização e mantidos na posição vertical. Previamente à união dos componentes, o conteúdo do interior dos implantes dos 3 grupos envolvidos no estudo foi coletado com o auxílio de escovas do tipo *microbrush* (Cavibrush, Dentscare LTDA, Joinville, SC, Brasil) para servirem como controle negativo da contaminação interna dos implantes. Ao total, foram obtidas 30 amostras, sendo 10 de cada tipo de conexão. Após a coleta, as pontas das escovas foram colocadas individualmente em microtubos contendo 150 µL de solução tampão TE (10 Mm Tris-HCl, 1 Mm EDTA pH 7,6). Em seguida, cada um dos tubos recebeu 150 µL de NaOH 0,5 M e foram armazenados a 4°C até o processamento pelo método de hibridização *DNA Checkerboard*. Em seguida, os conectores protéticos foram adaptados aos seus respectivos implantes nos grupos 1, 2 e 3 com o auxílio da chave manual (SIN®). O torque final foi dado com um torquímetro manual (SIN®) calibrado em 20 Ncm, conforme as instruções do fabricante. Por fim, as coroas metálicas foram adaptadas aos conjuntos montados com um torque final de 10 Ncm. Os 30 conjuntos implantes-conectores dos grupos 1, 2 e 3 tiveram o orifício superior, usado para a fixação das coroas, selado com uma camada de guta-percha (DFL Hygienic, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cola adesiva à base de cianoacrilato (Loctite, Henkel, Dusseldorf, Alemanha). A Figura 21 ilustra a seqüência de montagem dos componentes sobre os implantes.

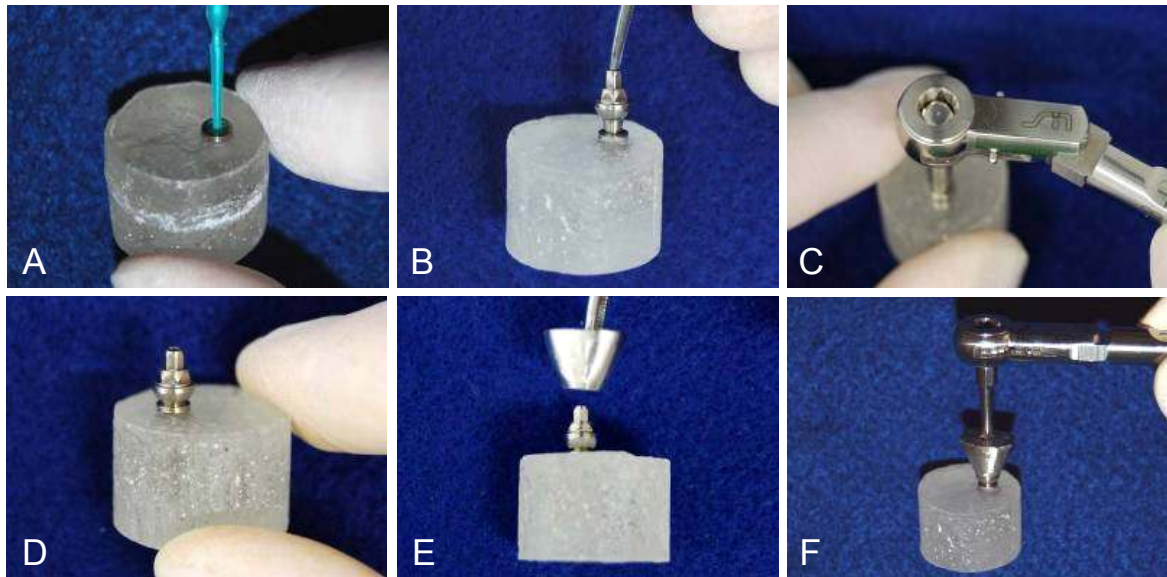


Figura 21 – A: Coleta da amostras do interior dos implantes previamente à montagem; B: Posicionamento do componente protético; C: Torque final de 20 Ncm; D: conjunto implante-conector montado; E: Adaptação da coroa metálica; F: Torque final de 10 Ncm.

Após a montagem dos componentes protéticos, os corpos de prova foram conectados em tubos de borracha (40 mm de altura e 20 mm Ø) previamente esterilizados por plasma de peróxido de hidrogênio. A Figura 22 ilustra a adaptação dos corpos de prova nos tubos de borracha e a colocação da saliva.

Os tubos foram fixados à base de resina acrílica dos corpos de prova com cola adesiva à base de cianoacrilato (Loctite) e serviram como um reservatório para a colocação da saliva durante o experimento. Com todo o sistema montado, foram inseridos no interior de cada um dos corpos de prova 1,5 mL da saliva coletada para o estudo. O volume de saliva inserido em cada corpo de prova foi suficiente para cobrir a interface de conexão entre o implante e o conector protético, sem atingir o orifício de acesso para o parafuso de fixação da coroa

metálica, de modo a impossibilitar a passagem dos microrganismos da saliva por qualquer outra via além da interface implante-conector protético.

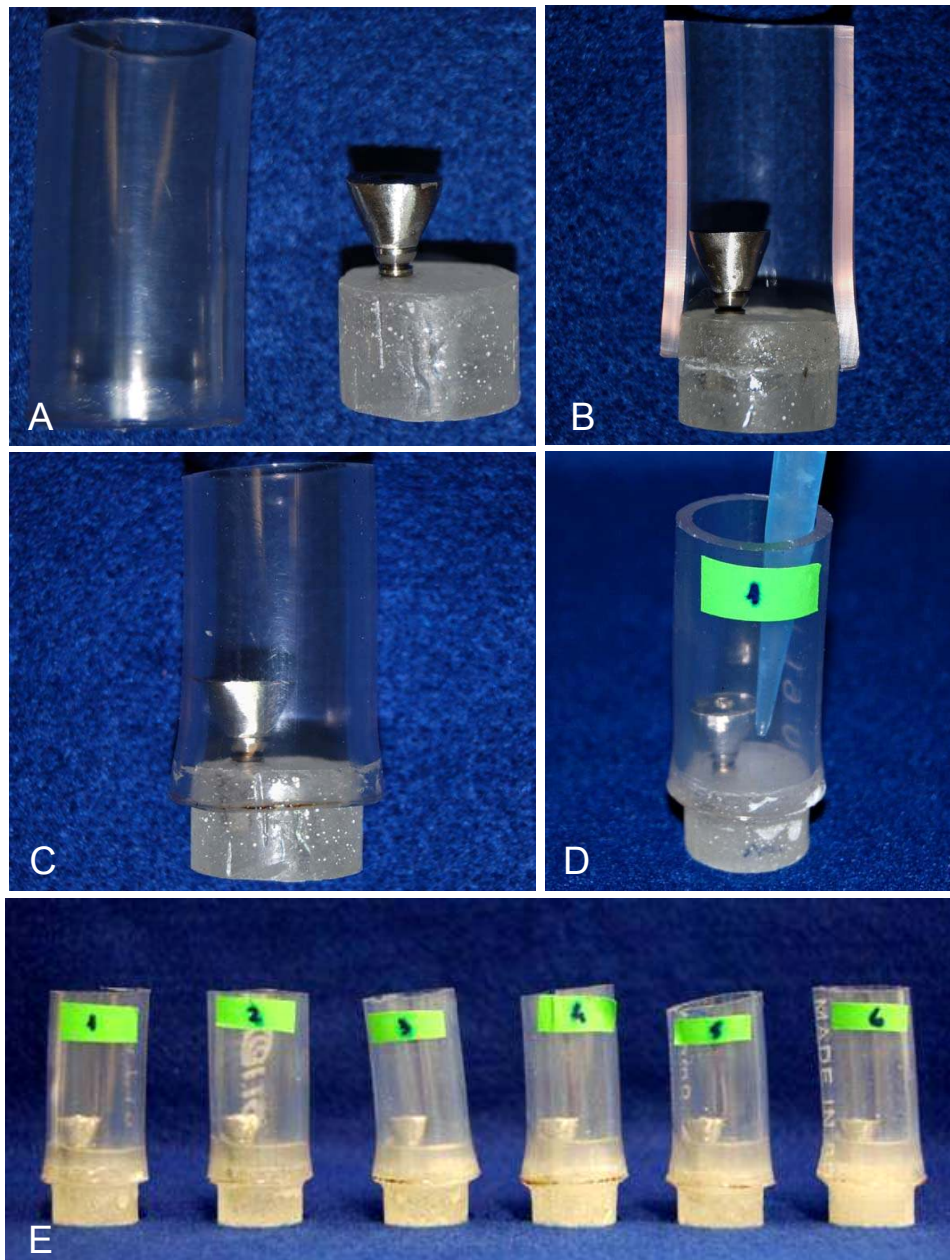


Figura 22 – A e B: Sistema de implante montado e tubo de borracha usado para compor o corpo de prova; C: Corpo de prova pronto após adaptação do tubo de borracha; D: Inserção da saliva; E: Vista frontal dos corpos, mostrando a interface do conjunto imersa em saliva.

O tubo contendo a saliva e o biofilme supra-gengival foi homogeneizado durante 3 minutos em um agitador de tubos e a saliva foi inserida no interior dos corpos de prova com o auxílio de uma pipeta de precisão automática (Gilson, UK).

Foram coletadas, também com escovas microbrush, 12 amostras da saliva utilizadas para imersão dos corpos de prova. Ao final do período de ensaio de carga cíclica, foram coletadas 12 amostras da saliva remanescente nos tubos, para a verificação da viabilidade das espécies presentes na saliva após o experimento.

Montagem dos corpos de prova sobre a máquina de simulação carga cíclica

Para o ensaio de aplicação de carga cíclica sobre os conjuntos implantes-conectores, simulando o efeito da mastigação humana, foi utilizada uma máquina de simulação de fadiga (Elquip, São Carlos, SP, Brasil) do Laboratório de Solda à Laser e Corrosão da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Esta máquina possibilita a condução de ensaios dinâmicos de fadiga sobre 6 corpos de prova simultaneamente. Os 6 pistões usados para a aplicação de carga atuam de forma independente sobre cada corpo de prova. A força gerada sobre o corpo de prova em cada ciclo de carga é dada por um sistema de molas, controlado através de uma célula de carga. A máquina pode ser precisamente calibrada para a aplicação de uma carga até o limite máximo de 300N, com uma frequência de 1,8 Hz. A máquina possui um sistema de termociclagem integrado à base de fixação dos corpos de prova que permite a manutenção da temperatura programada

durante todo o teste, com uma variação de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. O processo de aplicação da carga é totalmente automatizado.

Os corpos de prova contendo os conjuntos implantes e conectores imersos em saliva foram cuidadosamente fixados à base da máquina de ensaios. Os corpos de prova ficaram justapostos, uma vez que suas bases em resina acrílica foram construídas com a mesma dimensão dos nichos de fixação da máquina. Os pistões de aplicação de carga foram ajustados para incidirem simultaneamente sobre todas as coroas montadas a uma distância de 4 mm do longo eixo do implante, simulando desta forma uma condição de força excêntrica. Todo o sistema foi selado com uma película flexível de ação aderente (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, EUA), o que permitiu o isolamento do meio externo. O sistema de termociclagem foi ajustado para uma temperatura de 37°C , simulando a temperatura da cavidade oral, mantendo por condução a temperatura no interior dos tubos de borracha durante todo o experimento. A máquina foi programada para a aplicação controlada de uma carga de 120 N sobre cada corpo de prova, com uma frequência de 102 ciclos por minuto (1,8 Hz), durante 500.000 ciclos. A Figura 23 ilustra a seqüência de montagem dos corpos de prova na máquina de ciclagem.

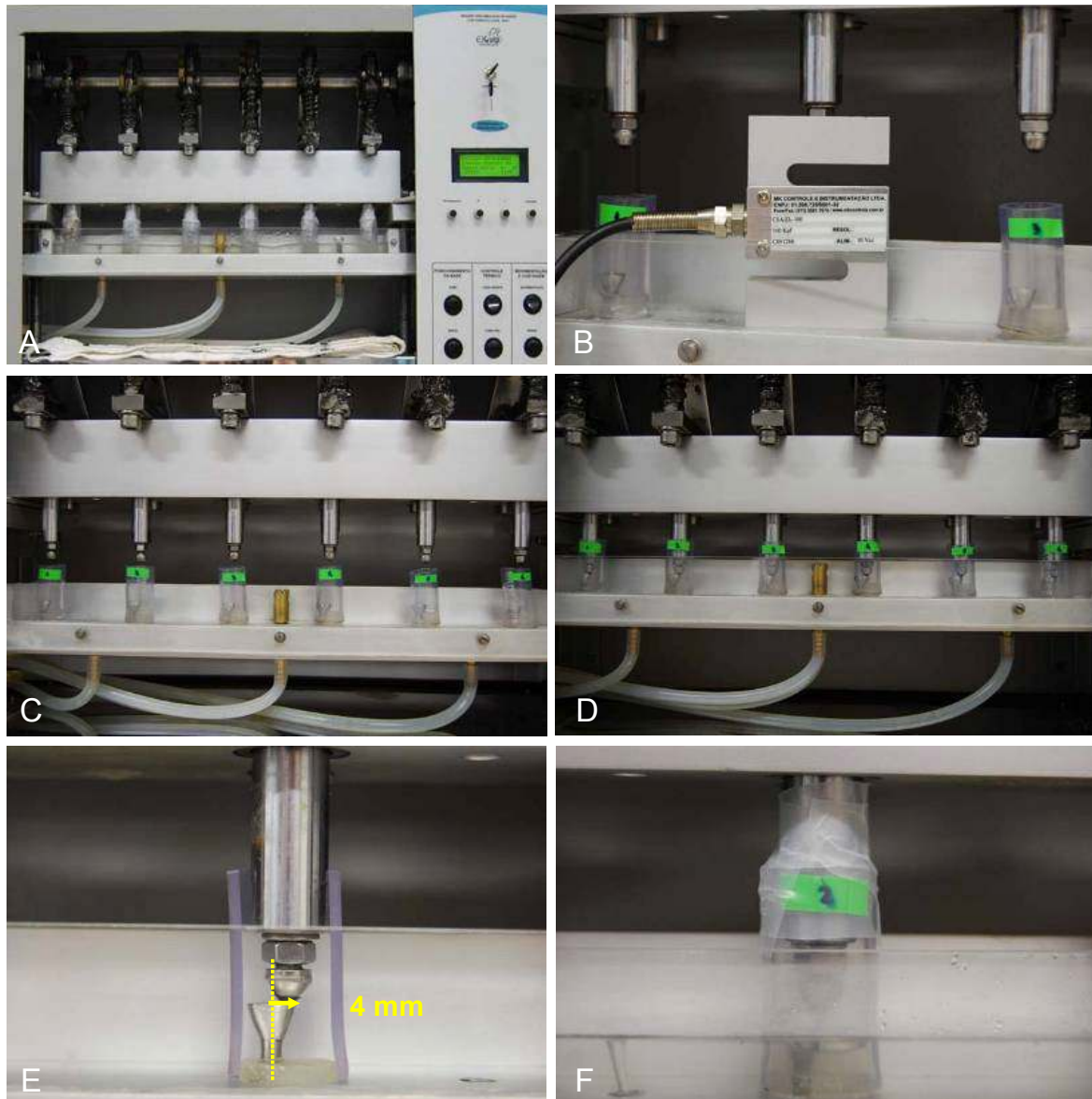


Figura 23 – A: Máquina usada para a ciclagem de carga; B: Calibração com a célula de carga dos pistões de aplicação da carga em 120 N; C e D: Posicionamento dos corpos de prova e pistões de carga; E: O pistão de carga incide a 4 mm do longo eixo do implante; F: Selamento do conjunto com parafilme e regulação da temperatura do sistema em 37°C.

Teste de contaminação dos grupos controles

Os conjuntos implantes-conectores dos grupos controles dos 3 tipos de conexões avaliadas foram testados quanto à passagem de microrganismos através da interface de forma estática, ou seja, sem a aplicação de ciclos de carga. Os implantes foram retirados de suas embalagens, apreendidos com o

auxílio de uma pinça forte, tipo porta agulhas, e mantidos na posição vertical. Em seguida, os respectivos conectores protéticos foram adaptados aos implantes com o auxílio das chaves manuais (SIN[®]). Os componentes tiveram o mesmo torque final dos implantes submetidos à ciclagem de carga (20 Nm), dado com o torquímetro manual (SIN[®]). Após a união, os conjuntos implantes-conectores dos 3 grupos foram inseridos dentro de microtubos individuais, aos quais foram adicionados 200 µL da saliva humana coletada (Figura 24). Este volume foi o suficiente para cobrir a interface entre o implante e o conector protético, restringindo a possibilidade da passagem de microrganismos somente por esta via. Os microtubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C em condições de microaerofilia durante 7 dias. Após este período, os implantes foram reabertos para coleta do material.

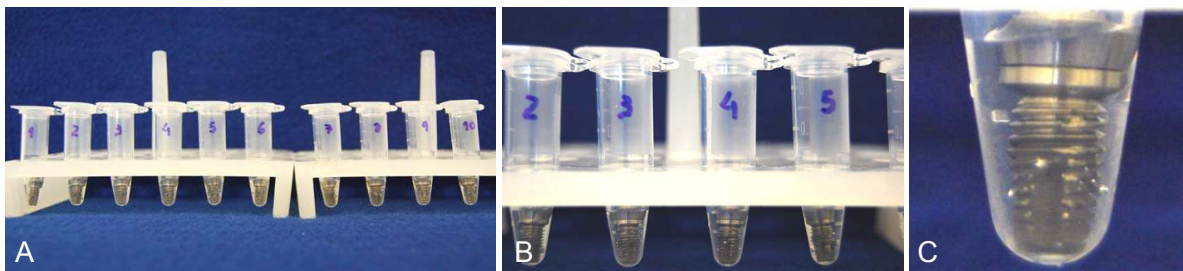


Figura 24 – A e B: Implantes imersos em saliva para o teste de contaminação estático (Controle); C: O volume de saliva usado para incubar os conjuntos foi o mínimo suficiente para cobrir a interface implante-conector.

Coleta do material para análise pelo método DNA Checkerboard

Ao final do período de aplicação de carga cíclica nos grupos experimentais e dos 7 dias de incubação dos grupos controles, os implantes foram reabertos para coleta do material. Os corpos de prova submetidos à ciclagem de carga foram removidos da máquina de simulação de fadiga e os tubos de borracha foram removidos da base de resina com o auxílio de tesouras clínicas. Todos os

conjuntos, grupo experimental e controle, foram lavados cuidadosamente com solução tampão salina fosfatada 0,1 M esterilizada (pH=7,0), e secados com compressas de gaze esterilizada.

Os conjuntos foram reabertos por meio das chaves manuais, no interior do fluxo laminar. O conteúdo do interior dos implantes e o material presente nas roscas dos parafusos de fixação dos seus respectivos conectores protéticos foram coletados com o auxílio de escovas do tipo *microbrush*. Após a coleta, as pontas das escovas foram colocadas individualmente em microtubos contendo 150 μ L de solução tampão TE. Em seguida, cada um dos tubos recebeu 150 μ L de solução NaOH 0,5 M e foram armazenado em 4°C até o processamento laboratorial (Figura 25).

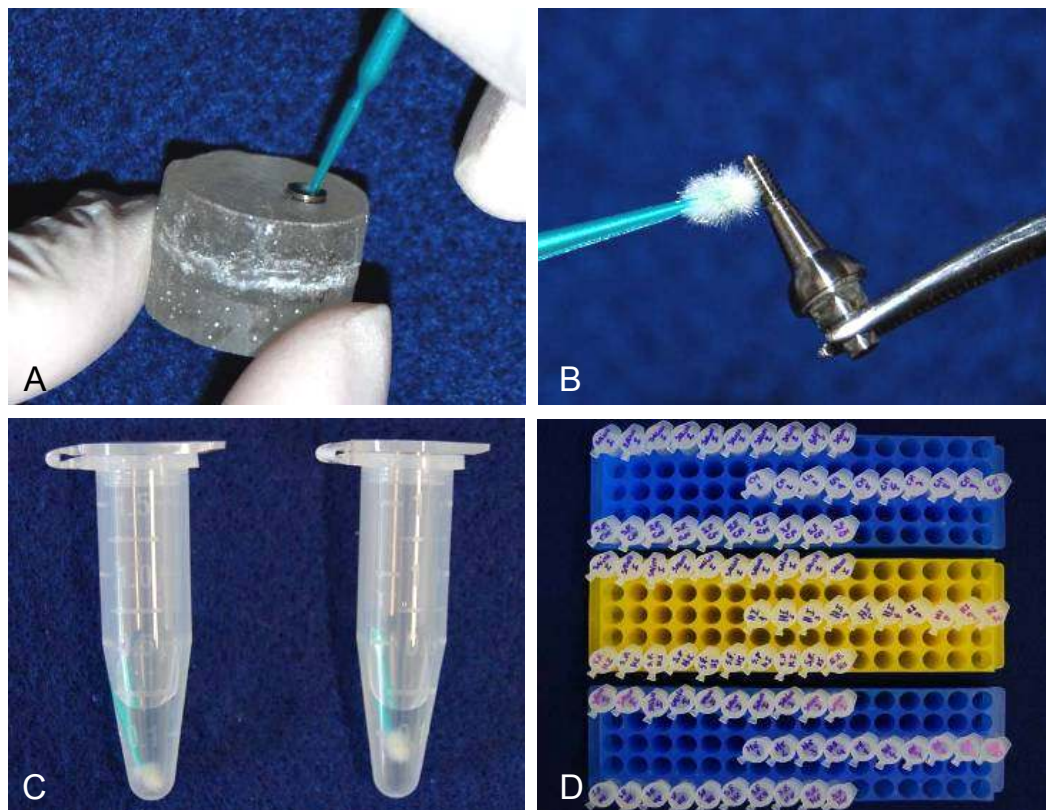


Figura 25 – Coleta das amostras do interior dos implantes (A) e parafusos de fixação dos conectores protéticos (B); C: As amostras foram colocadas em microtubos de reação com TE; D: As amostras coletadas das salivas usadas no teste e dos 3 grupos avaliados foram armazenadas em 4°C.

4. 2 Avaliação da contaminação bacteriana pelo método de hibridização DNA Checkerboard

Amostras do conteúdo interno dos conjuntos implantes-conectores foram coletadas com o objetivo de identificar e quantificar os microrganismos presentes no interior dos implantes, comparando os sistemas de conexão hexagonal externo, interno e cone morse. Para isso, foi utilizada a técnica de hibridização com sondas de DNA genômico DNA Checkerboard. A técnica foi empregada neste estudo com uma modificação em relação à técnica descrita por Nascimento et al. (2008).

Obtenção dos microrganismos avaliados no teste de contaminação

Os microrganismos selecionados para serem alvo de detecção no presente estudo estão listados na Tabela 1. Essas espécies foram selecionadas por serem consideradas uma das primeiras colonizadoras do biofilme bacteriano dentário ou por seus potenciais papéis no surgimento e desenvolvimento das doenças periodontais e peri-implantares (Cao et al., 1990; Zee et al., 1996). As cepas utilizadas para o crescimento e multiplicação das espécies bacterianas foram obtidas junto ao Groupe de Recherche en Écologie Buccale (*GREB*) da Faculté de Médecine Dentaire da Université Laval (Canadá).

Tabela 1- Espécies selecionadas para serem alvo no teste de contaminação bacteriana através da interface implante-conector.

Espécies Bacterianas

Agregatibacter actinomycetem comitans a
Agregatibacter actinomycetem comitans b
Bacteroides fragilis
Capnocytophaga gingivalis
Enterococcus faecalis
Eikenella corrodens
Porphyromonas gingivalis
Prevotella melaninogenica
Prevotella intermedia
Pseudomonas putida
Staphylococcus aureus
Streptococcus constelatus
Streptococcus mutans
Streptococcus oralis
Streptococcus sanguinis
Streptococcus sobrinus
Streptococcus salivarius
Streptococcus parasanguinis
Solobacterium moorei
Treponema denticola
Tanerella forsythensis
Veillonella parvula
Fusobacterium nucleatum
Fusobacterium periodonticum
Porphyromonas endodontalis
Peptostreptococcus micros
Neisseria mucosa
Pseudomonas aeruginosa
Streptococcus gordonii
Streptococcus mitis
Lactobacillus casei
Staphylococcus pasteurii

Crescimento e multiplicação bacteriana

Todas as etapas microbiológicas para o crescimento e multiplicação dos microrganismos selecionados foram realizadas no Laboratoire de Pathogénicité Microbienne da Faculte de Médecine Dentaire (Université Laval, Canadá).

Após a incubação apropriada de cada espécie dos microrganismos em meio de cultura líquido, uma alíquota do inoculo foi transferida para tubos de reação Falcon de 50 mL e centrifugados a 15000 rpm durante 30 minutos. O conteúdo sobrenadante foi desprezado e o sedimento (*pellets*) re-suspenso em solução fisiológica 0,7%. A partir do crescimento obtido, verificou-se a pureza da cultura e a confirmação da espécie por meio da semeadura em placas de Petri (20X100 mm), em meios de culturas apropriados (Figura 26).

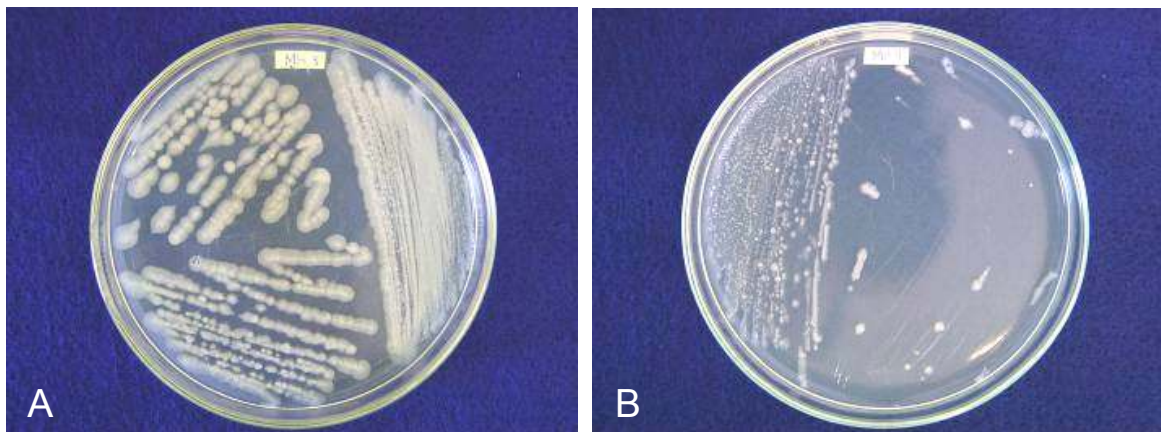


Figura 26 – Verificação da pureza das culturas microbianas após crescimento e multiplicação.

Extração do DNA genômico das espécies

As sondas de DNA utilizadas no teste microbiológico de detecção DNA Checkerboard são preparadas a partir do DNA genômico do microrganismo alvo. Após o procedimento de crescimento e multiplicação das espécies estudadas, seguiu-se com a extração do DNA genômico de acordo com o protocolo que segue abaixo. O mesmo protocolo foi utilizado para todas as espécies envolvidas no estudo.

Os tubos de ensaio contendo os microrganismos cultivados foram homogeneizados em um agitador de tubos durante 1 minuto e todo o conteúdo dos tubos foi transferido em alíquotas iguais de 1 mL para microtubos de reação.

Os tubos foram centrifugados a 13200 rpm durante 10 minutos para obtenção dos sedimentos (*pellets*). Todo o conteúdo sobrenadante dos microtubos foi descartado e sobre os *pellets* foram adicionados 700 µL de tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH=8; EDTA 20 mM; Polivinilpirrolidona 1%; CTAB 2%; β-Mercaptanol 0,2%) com proteinase K (100 µ/mL). Os microtubos foram homogeneizados por 1 minuto e incubados a 65°C durante 30 minutos. Os microtubos foram homogeneizados a cada 10 minutos durante a incubação. Após o período de incubação, foram adicionados 650 µL de CIA (Clorofórmio:álcool isoamílico – 24:1) em cada microtubo. Os tubos foram homogeneizados lentamente por 30 segundos e centrifugados a 13200 rpm durante 7 minutos. A fase aquosa de cada microtubo foi transferida para um tubo novo, ao qual foram adicionados 200 µL de tampão de extração sem proteinase K. Seguiu-se com a adição de 650 µL de CIA, homogeneização por 30 segundos e centrifugação a 13200 rpm durante 7 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para outro microtubo após a centrifugação, com a adição de mais 650 µL de CIA. Os microtubos foram centrifugados a 13200 rpm por 7 minutos. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes para cada microtubo. Por fim, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 1 volume de Isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). O tubo foi centrifugado a 13200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante dos microtubos foi removido e DNA do microrganismo, contido no

fundo do tubo, foi lavado com 50 µL de Etanol 70% (Merck) e centrifugado a 13200 rpm durante 1 minuto. Este procedimento foi repetido por 2 vezes. O etanol dos tubos foi removido, adicionando-se 60 µL de tampão TE (pH= 8) e 0,5 µL de RNase (20 mg/mL) em cada microtubo.

Purificação e quantificação do DNA genômico extraído

Os microtubos contendo os DNAs foram levados à centrifuga a 13200 rpm por 1 minuto. Removeu-se a solução sobrenadante e foi acrescentado 1,0 mL de etanol 70%. As fibras foram lavadas com etanol 70% até a remoção dos excessos de sais e carboidratos. Após a lavagem, removeu-se todo o etanol e o excesso com o auxílio de papel absorvente. Foram acrescentados 60 µL de TE (pH= 8) e os microtubos foram armazenados a 4°C. Após o processo de extração e purificação, o DNA foi submetido ao procedimento de quantificação e verificação do grau de pureza no aparelho espectrofotômetro GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

Análise em Gel de Agarose da integridade dos DNAs extraídos

Todos os DNAs extraídos foram submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) corado com brometo de etídeo para verificação da integridade de sua estrutura (peso molecular) e pureza. Como controle, foi utilizado um marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, 500 µg/mL).

A eletroforese em gel foi utilizada para se fazer mapas de restrição dos DNAs extraídos, que é um diagrama de uma molécula de DNA mostrando as

posições relativas dos sítios de clivagem das moléculas por uma enzima de restrição. Depois, comparam-se suas migrações eletroforéticas, possibilitando assim a construção de mapas de restrição.

Para esta análise, foram depositados 500 ng de DNA de cada espécie individualmente nos casulos da cuba de eletroforese (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), aos quais foram adicionados 2 µL de Load Buffer (6X) e 8 µL de água mili-Q. Uma corrente elétrica de 70 V e 100 mA foram aplicados sobre a cuba de eletroforese por 60 minutos. Ao final, os géis foram analisados em aparelho transiluminador com lâmpada UV.

Amplificação dos DNAs extraídos pela técnica do 16S rDNA-based PCR

Todos os DNAs extraídos foram amplificados pela técnica do 16S rDNA-based PCR para posterior confirmação das bactérias selecionadas para o estudo por sequenciamento do gene 16S DNA ribossômico (rDNA). Este gene representa a identidade genética de cada espécie.

Um par de *primers* bacterianos universais (*Forward e Reverse Primers*), que se ligam na mesma posição em quase todos os genes 16S rDNA bacterianos, foram construídos e usados como controle positivo para a reação de PCR.

O protocolo de amplificação utilizado foi o descrito por Paster et al. (2001). Brevemente, cada microtubo de reação apresentava 1 µL de cada DNA extraído, ao qual foram adicionados 2,5 µL de 10X High Fidelity PCR Buffer (600 mM Tris-SO₄; 180 mM Sulfato de amônio; pH= 8,9; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µL de 12,5 mM dNTP mix PCR grade (Invitrogen); 0,625 µL de MgSO₄ 50 mM; 0,5 µL de primer 27 *forward* 10 µM; 0,5 de primer 1492 *reverse* 10 µM e 0,25 µL de *Taq*

polimerase (Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Storage Buffer, 20 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50% glicerol; pH= 8). O volume final de cada microtubo foi completado até 25 μ L com água mili-Q esterilizada. Foi feito um tubo com 1 μ L de água mili-Q para ser utilizado como controle negativo. Os microtubos foram levados ao termociclador (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA) e submetidos ao seguinte ciclo de amplificação:

30 ciclos	94°C	-	8 minutos
	95°C	-	45 segundos
	60°C	-	45 segundos
	72°C	-	90 segundos
	72°C	-	10 minutos
	4°C	-	<i>overnight</i>

Foram realizados 30 ciclos por reação e respeitando as seguintes condições: etapa de desnaturação de 45 segundos a 95°C, etapa de anelamento de 45 segundos a 60°C e etapa de extensão de 90 segundos a 72°C.

Purificação dos DNAs amplificados pelo 16S rDNA-based PCR

Previamente ao procedimento de sequenciamento genético, os DNAs extraídos sofreram um processo de purificação. Para um maior controle do processo, foi utilizado o kit de purificação de DNA QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Os produtos de amplificação pelo PCR foram submetidos ao seguinte protocolo de purificação:

- 1) Foram adicionados 5 volumes de tampão PB à 1 volume da reação de PCR e o conteúdo foi homogeneizado.
- 2) A amostra foi transferida para uma coluna QIAquick fornecida pelo kit para ligar o DNA. As colunas foram centrifugadas por 60 segundos a 13200 rpm.
- 3) O líquido do tubo coletor foi descartado. A coluna foi reposicionada sobre o mesmo tubo.
- 4) Foram adicionados 750 µL de tampão PE na coluna QIAquick. As colunas foram centrifugadas por 60 segundos a 13200 rpm.
- 5) O líquido do tubo coletor foi descartado e a coluna reposicionada sobre o mesmo tubo para uma nova centrifugação por 60 segundos.
- 6) A coluna QIAquick foi colocada sobre um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- 7) Foram adicionados 30 µL do tampão EB (Tris 10mM, pH 8,5) no centro da membrana da coluna para eluir o DNA. A coluna foi centrifugada por 60 segundos a 13200 rpm. Ao final deste procedimento, obtêm-se em cada tubo o DNA amplificado e centrifugado.

Quantificação do DNA Amplificado pelo 16S PCR após Purificação

Após o processo de purificação, os produtos de amplificação de PCR foram submetidos ao procedimento de quantificação e verificação do grau de pureza no aparelho espectrofotômetro GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech). Cada amostra de DNA foi diluída na proporção de 1:100 com solução tampão TE.

Verificação dos DNAs amplificados pelo 16S rDNA em Gel de Agarose

Todos os DNAs amplificados, produtos da reação de PCR, foram submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sigma) corado com brometo de etídeo para verificação da integridade de sua estrutura (peso molecular) e pureza. Como controle, foi utilizado um marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III).

Para esta análise, foram depositados 1 µg de DNA de cada PCR individualmente nos casulos da cuba de eletroforese (Fisher), aos quais foram adicionados 2 µL de Load Buffer (6X) e 8 µL de água mili-Q. Uma corrente elétrica de 100 V e 100 mA foram aplicados sobre a cuba de eletroforese por 90 minutos. Ao final, os géis foram analisados em aparelho transiluminador com lâmpada UV.

Sequenciamento dos genes 16S rDNA amplificados

Todos os DNAs amplificados foram submetidos à análise de sequenciamento genético para a confirmação das espécies selecionadas para o estudo. Todas as análises foram realizadas no Centre de Recherche du CHUL (Centre Hospitalier Université de Québec, Université Laval, Canadá). Para cada sequenciamento, foram utilizados 50 ng do DNA amplificado e 5 µL de um dos primers utilizados no processo de amplificação (1492 *reverse* ou 27 *forward*) na concentração de 1,6 µM). Os produtos de sequenciamento de cada amostra foram identificados utilizando-se a base de dados do U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health.

Amplificação dos DNAs genômicos pela técnica MDA (Multiple Displacement Amplification)

Ciclo de Amplificação

Após a confirmação de todas as espécies bacterianas envolvidas no estudo pelo sequenciamento do gene 16S rDNA, todos os DNAs obtidos pelo procedimento de extração foram amplificados pela técnica MDA por meio do kit GenomiPhi V2 DNA Amplification (GE Healthcare). Esta técnica permite a obtenção de grandes quantidades de material genético para a construção de sondas e de amostras controle a partir de quantidades mínimas, e tem se mostrado também útil na amplificação do DNA proveniente de amostras clínicas, auxiliando na identificação de microrganismos que se encontram em quantidades extremamente reduzidas na microbiota oral.

Para o processo de amplificação, foram amplificados 10 ng de cada DNA genômico, aos quais foram adicionados 9 µL de tampão Sample Buffer (50 Mm Tris-HCl pH 8,2; 0,5 Mm EDTA contendo *Random Hexamer Primers*). Os tubos foram levados ao termociclador onde permaneceram a 95°C por 3 minutos para desnaturação das cadeias de DNA. Imediatamente, são resfriados em gelo. São acrescentados em cada tubo, no gelo, 10 µL da solução Máster Mix (Phi 29 DNA polimerase, hexamers primers, nucleotídeos e sais). Os tubos foram incubados no termociclador a 30°C durante 90 minutos, para a reação de amplificação. Posteriormente, a temperatura foi aumentada até 65°C para inativação da reação de exonuclease da enzima Phi 29 DNA polimerase, que pode degradar o produto

de amplificação. Os tubos contendo os DNAs genômicos amplificados foram armazenados em -20°C até a marcação das sondas de DNA.

Quantificação dos DNAs Genômicos Amplificados

Para a quantificação dos produtos de amplificação, foi utilizado o kit Quant-iT PicoGreen dsDNA quantification reagent (Invitrogen, Eugene, OR, EUA).

Inicialmente, o DNA controle foi diluído até a concentração de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$. Um uma curva com 8 diluições do DNA controle (λDNA) foi constituída para servir de base de comparação para a quantidade dos DNAs genômicos amplificados. Os valores de referência da curva controle estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Curva controle para a quantificação dos DNAs amplificados pela técnica do MDA.

Controle	λDNA 10ng/ μL	Volume 1xTE	Quantidade λDNA (ng)	Concentração Final	Fluorescence Measure
1	60 μL	40 μL	600	6ng/ μL	*
2	50 μL	50 μL	500	5ng/ μL	*
3	40 μL	60 μL	400	4ng/ μL	*
4	20 μL	80 μL	200	2ng/ μL	*
5	10 μL	90 μL	100	1ng/ μL	*
6	5 μL	95 μL	50	500pg/ μL	*
7	2,5 μL	97,5 μL	25	250pg/ μL	*
8	0	100 μL	0	0	Branco

* Representam os valores controles a serem obtidos após a análise em Espectrofluorímetro

As amostras de DNA genômico amplificados foram diluídas para a quantificação. Após o preparo dos controles e amostras, o reagente PicoGreen foi diluído na proporção 1:25 e 100 μL do reagente diluído foram adicionados em cada tubo contendo o DNA genômico amplificado. A seqüência de preparo das amostras está representada na Figura 27.

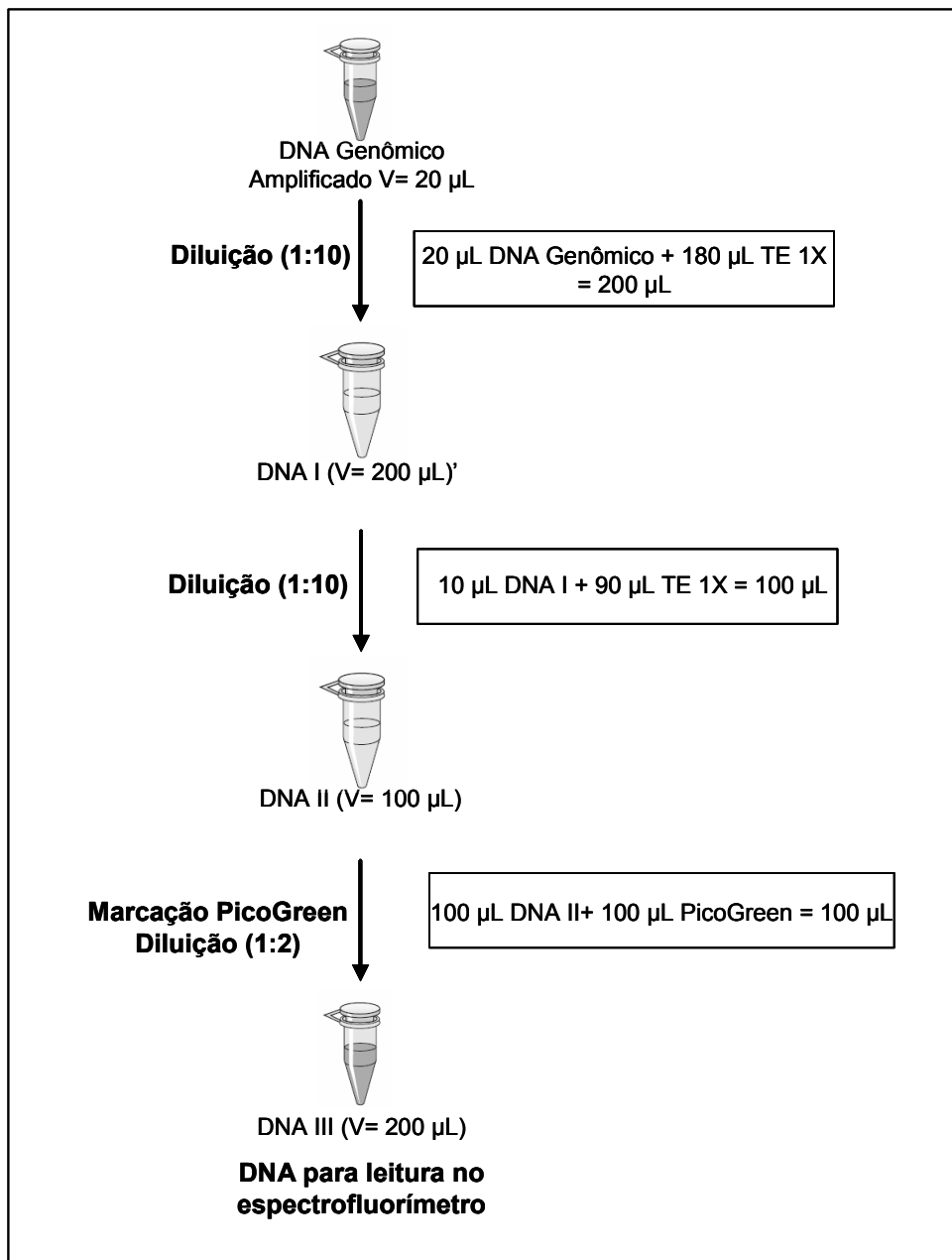


Figura 27 – Fluxograma representando a diluição das amostras de DNA amplificadas para quantificação.

As amostras e controles foram submetidos a análise em aparelho espectrofluorímetro (VersaFluor, Bio-Rad) com filtro de excitação de 480 nm e filtro de leitura de 520 nm. Ao final da leitura dos controles, é construído um gráfico com uma curva gerada pelos dados obtidos. Através da fórmula gerada pelo

gráfico e os dados obtidos na leitura de cada amostra, calcula-se a quantidade de DNA genômico produzida em cada reação de amplificação.

Análise dos DNAs amplificados pela técnica do MDA em Gel de Agarose

Todos os DNAs amplificados pela técnica do MDA foram submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma) corado com brometo de etídeo para verificação da integridade de sua estrutura. Como controle, foi utilizado um marcador de peso molecular conhecido (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III).

Para esta análise, foram depositados 500 ng de cada DNA amplificado nos casulos da cuba de eletroforese (Fisher), aos quais foram adicionados 2 µL de Load Buffer (6X) e 8 µL de água mili-Q. Uma corrente elétrica de 70 V e 100 mA foram aplicados sobre a cuba de eletroforese por 60 minutos. Ao final, os géis foram analisados em aparelho transiluminador com lâmpada UV.

Processamento das Amostras coletadas do interior dos implantes pela técnica de hibridização DNA Checkerboard

Confecção das Sondas Genômicas de DNA

O protocolo utilizado para a marcação dos DNAs amplificados pela técnica do MDA foi aquele estabelecido pela empresa fabricante do marcador genômico (*Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System*, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng

do DNA genômico do microrganismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 3 ng/ μ L em solução de hibridização. Os DNAs foram diluídos dentro de microtubos à uma concentração de 10 ng/ μ L em um volume final 10 μ L. Os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos. Imediatamente, foram resfriados em gelo durante 5 minutos para manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os tubos mantidos no gelo, foram adicionados os componentes do kit de marcação, primeiro 10 μ L de Reaction buffer, 2 μ L de Labelling reagent e 10 μ L de cross-link solution (1:4) [GE Healthcare]. Os tubos foram levemente agitados e incubados a 37°C por 30 minutos (Figura 28).



Figura 28 – A: Kit usado para marcação das sondas de DNA genômico; B: Reagentes de marcação (labeling reagent, cross-linker solution e buffer reaction respectivamente); C: Sondas marcadas.

Verificação da sensibilidade e especificidade das sondas marcadas

A sensibilidade do teste foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridação positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células bacterianas, de acordo com o proposto por Socransky et al. (1994). Para isso, amostras de DNA genômico usados para a confecção das sondas foram hibridizadas nas quantidades de 10^5 e 10^6 células contra as próprias sondas marcadas.

Processamento e aplicação das amostras

Os tubos armazenados em 4°C, contendo as amostras provenientes do interior dos implantes, foram agitados por 4 minutos em um agitador de tubos (AP 56, Phoenix, Brasil) para a desagregação total do conteúdo coletado pela escova *microbrush*. Ao final do período de agitação, as pontas das escovas foram removidas com o auxílio pinças clínicas esterilizadas. Os tubos foram então fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA, e logo resfriados em gelo. Após a desnaturação, as amostras foram neutralizadas com a adição de 800 µL de acetato de amônio 5 M (Figura 29).

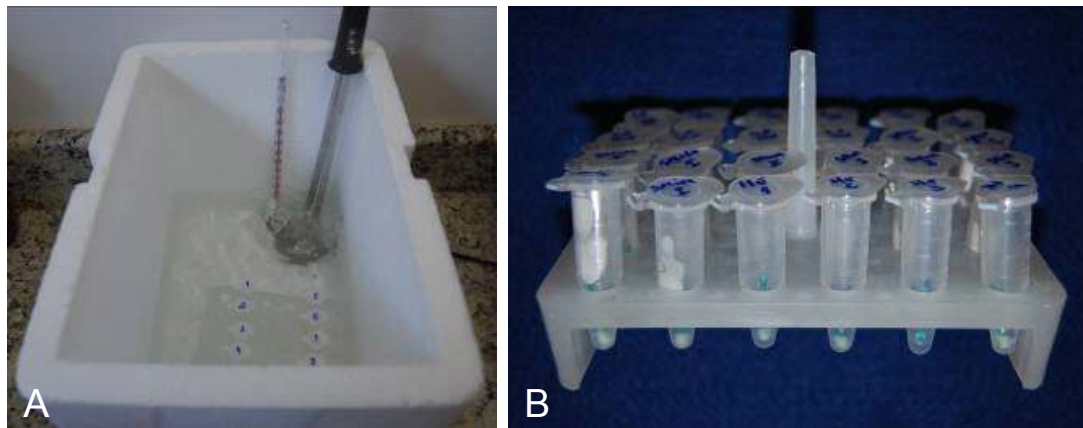


Figura 29 – A e B: Desnaturação do DNA das amostras provenientes dos implantes.

Uma placa metálica denominada Minislot 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) possui 30 canaletas dispostas paralelamente, e é utilizada para a aplicação das amostras de DNA sobre uma membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare) posicionada sob o aparelho. A membrana tem carga positiva e deve medir 15 X 15 cm, cobrindo desta forma todo o comprimento das canaletas. O

aparelho possibilita a deposição de 28 amostras diferentes de DNA em canaletas individuais, mais 2 canaletas onde são aplicados os controles correspondentes a 10^5 e 10^6 células de cada espécie estudada. Cada amostra de DNA e controles foram depositados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão, e após 5 minutos, os DNAs foram depositados sobre a membrana de nylon com o auxílio de uma bomba a vácuua ligada ao equipamento (Figura 30). A membrana foi removida do aparelho e o DNA fixado na mesma através da exposição ao calor de 80° C no forno de hibridização (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences) por 2 horas.

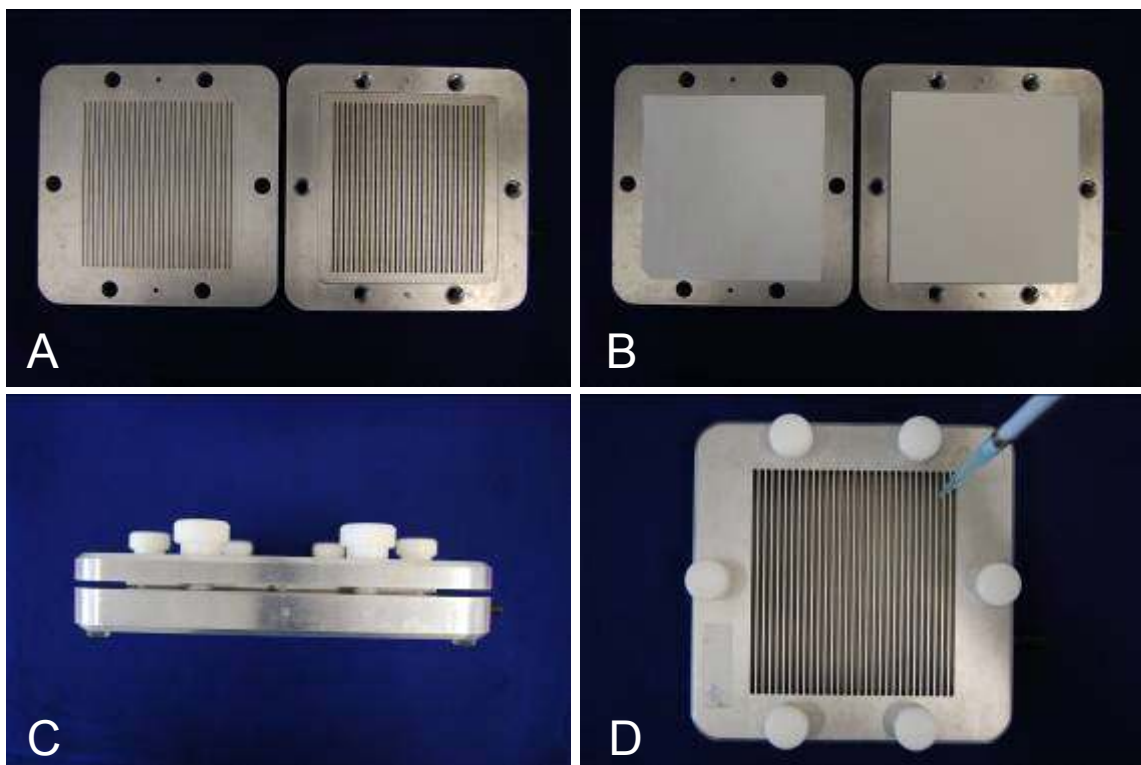


Figura 30 – A: Aparelho Minslot 30 aberto; B: Posicionamento da membrana de nylon sobre uma das placas do aparelho (esquerda) e papel filtro (direita); C: Membrana posicionada no aparelho fechado; D: Aplicação em canaletas individuais das amostras de DNA coletadas dos implantes.

Pré-Hibridização das amostras

Após a fixação dos DNAs das amostras e controles, a membrana foi pré-hibridizada no forno a 60 °C, durante 2 horas, em uma solução de NaCl 1 M (Merck) e Blocking reagent (4%, GE Healthcare) diluídos em 30 mL de Hybridization Buffer (GE Healthcare). A Figura 31 ilustra o forno de hibridização utilizado no processamento das membranas.



Figura 31 – Forno de hibridização utilizado para a fixação das amostras de DNA sobre a membrana, pré e hibridização das membranas, além dos procedimentos de lavagem.

Aplicação das sondas de DNA marcadas e reação de hibridação

Após a pré-hibridização, a membrana foi posicionada em um aparelho de acrílico (Miniblotter 45, Immunetics) para aplicação das sondas marcadas (Figura 32). O aparelho permite a aplicação de até 45 sondas distintas. A membrana é posicionada de forma que as amostras de DNA previamente aplicadas fiquem

posicionadas em um ângulo de 90° com os canais do aparelho de acrílico, formando um *checkerboard* no padrão 30 (amostras) X 45 (sondas). Cada canal foi usado como uma câmara para reações de hibridização independentes. Foram aplicadas, individualmente no interior de cada canal, quantidades de sonda pré-estabelecidas no teste de verificação da sensibilidade e especificidade das sondas marcadas. Após a aplicação das sondas, o aparelho foi embrulhado várias vezes em filme de PVC e embalado em saco plástico, evitando desta forma possibilidade de desidratação da membrana. A hibridização da membrana foi realizada a 60°C no forno, sob agitação suave, durante 16 horas.

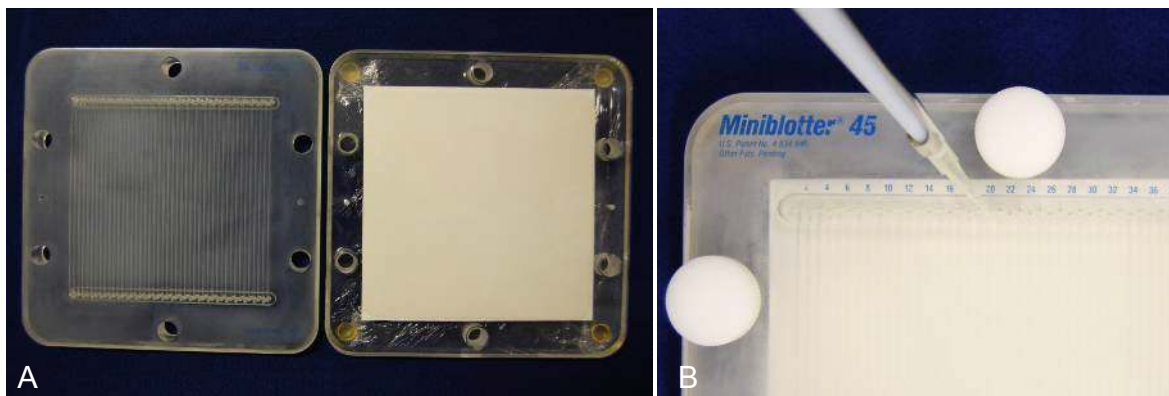


Figura 32 – Aparelho Miniblotter 45 para aplicação das sondas. A: Membrana posicionada sobre uma das placas do aparelho; B: Após o fechamento do aparelho, as sondas são aplicadas individualmente nas canaletas.

Lavagem para remoção das sondas

Após a reação de hibridização, a membrana passou por um processo de lavagem, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Foram inicialmente realizadas duas lavagens de 35 minutos cada, a 65° C, com 500 mL de uma solução contendo Urea 2 M (Sigma), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1% (Sigma), NaH₂SO₄ 50

mM (pH= 7; Merck), NaCl 150 mM (Merck), MgCl₂ 1mM (Merck) e Blocking Reagent (GE Healthcare). Duas lavagens seqüentes foram realizadas em temperatura ambiente, durante 15 minutos cada, com 500 mL de uma solução contendo Tris 1M (Sigma), NaCl 2M (Merck) e MgCl₂ 1M (Merck). Todas as lavagens foram conduzidas sob vigorosa agitação.

Deteção dos sinais de hibridização

A deteção dos sinais de hibridização é feita através de uma reação de quimiluminescência. Após as lavagens, foram aplicados sobre a membrana 6,7 mL do reagente de deteção CDP-Star[®] (GE Healthcare), deixando-o agir em toda a superfície por 5 minutos. Após este período, o excesso do reagente foi removido e a membrana foi selada em saco plástico para o procedimento de exposição.

Exposição da membrana e Revelação

A membrana selada foi posicionada para exposição em filme para autoradiografia (HyperFilm, GE Healthcare) dentro de um cassete apropriado (hypercassette, GE Healthcare). Foram realizadas 3 exposições diferentes para cada membrana processada (15, 30 e 60 minutos). Em seguida, os filmes foram revelados e fixados em soluções para processamento radiográfico convencional (Kodak, Brasil). Ao final, obtém-se um filme radiográfico com os sinais de hibridização detectados pelas intersecções entre as amostras e sondas, onde as linhas horizontais representam as sondas marcadas e as verticais as amostras dos implantes, configurando desta forma um “tabuleiro de xadrez” - *DNA-Checkerboard* (Figura 33).

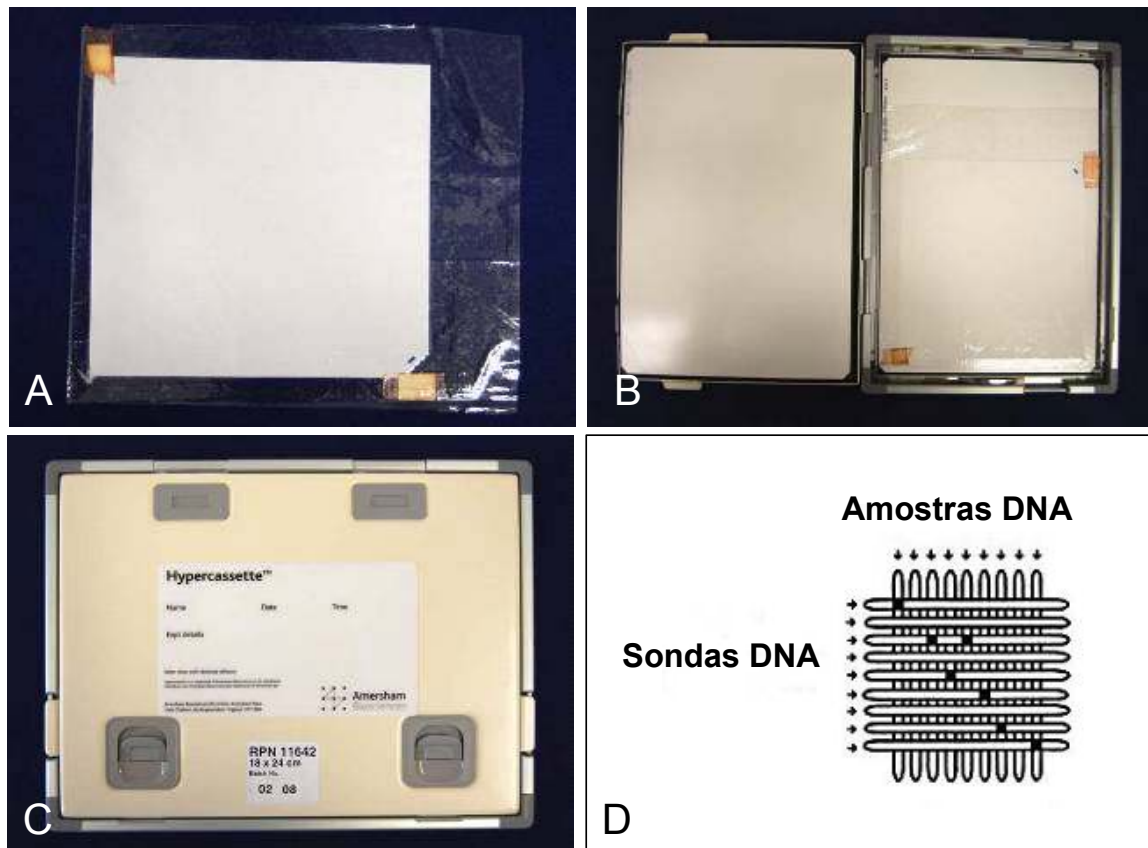


Figura 33 – A: Membrana embalada para exposição radiográfica; B e C: Membrana posicionada no cassete radiográfico; D: Esquema exemplificando a reação de hibridação pelo método DNA-Checkerboard, onde as linhas horizontais representam as sondas e as verticais as amostras dos implantes, configurando desta forma um “tabuleiro de xadrez”. Os sinais nos cruzamentos das linhas representam os híbridos obtidos.

Interpretação dos Sinais de Hibridização

A leitura visual dos resultados é semi-quantitativa, feita por meio da comparação da intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras testadas contra as sondas marcadas em relação à intensidade das amostras controle colocadas nas duas últimas canaletas do Minislot 30, que equivalem a 10^5 e 10^6 células das espécies alvo. Os sinais devem ser registrados como 0: não detectado; 1: $< 10^5$ células; 2: $\sim 10^5$; 3: $10^5 \sim 10^6$; 4: $\sim 10^6$; e 5: $> 10^6$

células, de acordo com Socransky et al. (2004). Desta forma, obtém-se um número aproximado de células bacterianas em cada amostra estudada.

Por fim, os filmes radiográficos são digitalizados e as imagens obtidas são inseridas no software Image Quant TL (GE Healthcare). O software possibilita a obtenção do número aproximado de células bacterianas presentes em cada amostra avaliada através da comparação da intensidade de pixels dos sinais de hibridização entre as amostras e controles. A Figura 34 ilustra a seqüência de quantificação dos sinais das amostras obtidas nas membranas, por meio do software.

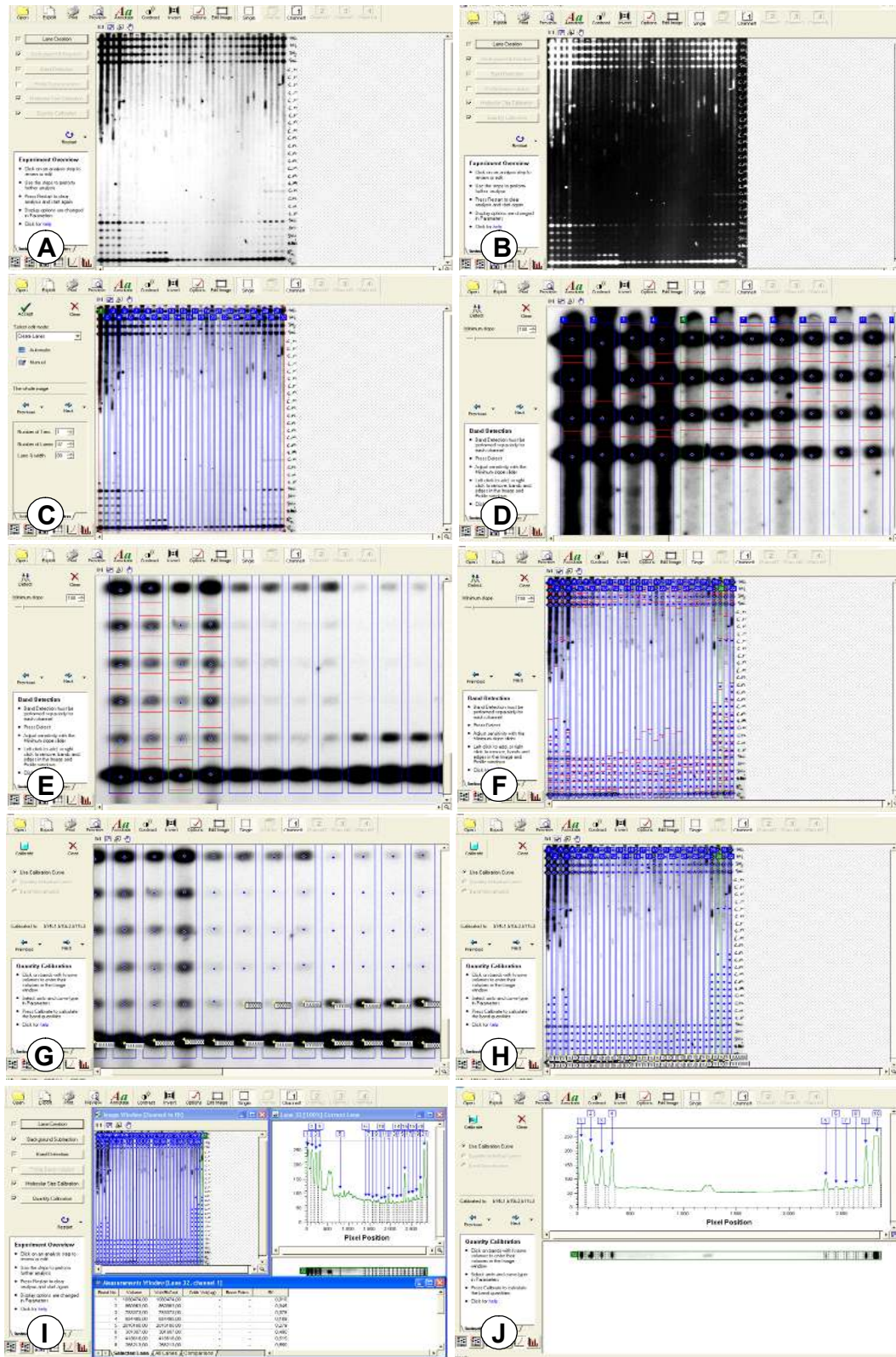


Figura 34 – A: Inserção da imagem da membrana digitalizada no software; B: a imagem pode ser convertida para a forma negativa; C: seleção das bandas a serem analisadas; D e E: marcação dos sinais de hibridização a serem quantificados; F: imagem da membrana com todos os sinais das amostras e controles marcados; G: determinação dos valores dos sinais controles; H: calibração de todos os sinais em função dos controles; I: obtenção dos resultados; J: gráfico mostrando as diferentes intensidades de pixels das amostras avaliadas.

Análise dos dados

O número de células bacterianas (Contagem) e os percentuais de colonização (Incidência) das espécies avaliadas foram fornecidos para cada grupo estudado nas duas condições propostas, com e sem aplicação de carga cíclica, além da saliva usada no teste. Os dados obtidos foram analisados pelo método de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunn para comparações entre os diferentes grupos, e Mann-Whitney para a comparação da saliva antes e após o teste, ambos utilizando o software estatístico NCSS 2007 (NCSS, Kaysville, USA). Para comparar as contagens e incidência das espécies bacterianas em cada grupo, os dados foram avaliados somando-se todos os microrganismos, sem discriminar entre as espécies estudadas. Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5. 1 Resultado do Teste Piloto

Os 4 implantes usados para o teste piloto apresentaram sinais de contaminação bacteriana pela interface implante-conector com ou sem a aplicação de carga cíclica. Das 12 espécies avaliadas, tanto os implantes de conexão hexagonal externa como os de conexão tipo cone morse apresentaram reação de hibridização positiva para os microrganismos *C. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Não houve diferença significativa em relação à contagem de microrganismos presente na saliva no início e ao final do teste de carga ($p < 0,05$). A Figura 35 ilustra as reações de hibridização das amostras provenientes dos implantes e salivas usadas no teste.

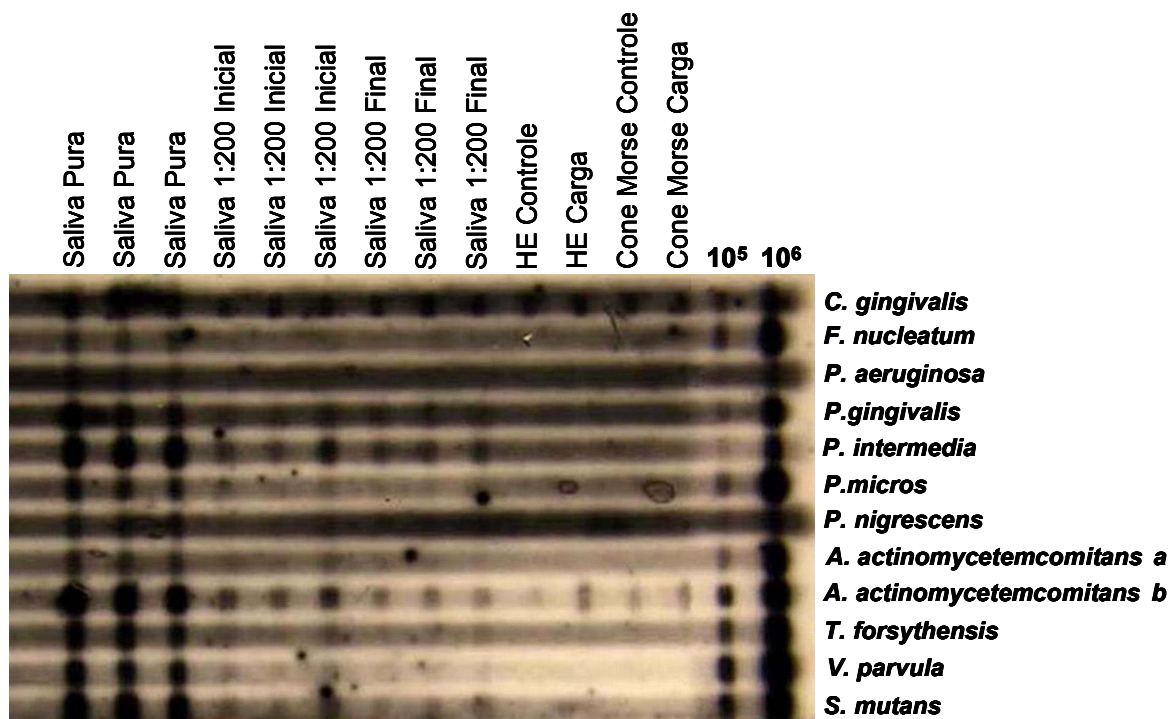


Figura 35 - Reação de hibridização das amostras de saliva e conteúdo do interior dos implantes usados no teste piloto de carga sobre os implantes. As linhas verticais representam as amostras (HE: hexágono) e controles 10^5 e 10^6 (células bacterianas das espécies alvo), e as linhas horizontais as sondas das 12 espécies bacterianas avaliadas.

5. 2 Resultados dos testes de extração e amplificação de DNA

Quantificação dos DNAs genômicos após extração

Na Tabela 3 estão representadas as concentrações de DNA genômico obtidos para cada espécie bacteriana após o procedimento de extração e seus respectivos valores de grau de pureza.

Tabela 3 – Concentração e grau de pureza dos DNAs extraídos das espécies bacterianas estudadas obtidos após leitura em aparelho espectrofotômetro.

Espécie Bacteriana	Concentração []	Grado de Pureza 260/280
<i>A a a</i>	0,170 µg/µL	1,82
<i>A a b</i>	0,098 µg/µL	1,84
<i>B.fragilllis</i>	0,980 µg/µL	2,1
<i>C.gingivalis</i>	0,144 µg/µL	1,80
<i>E.faecalis</i>	0,213 µg/µL	1,97
<i>E.corrodens</i>	0,850 µg/µL	1,85
<i>P.gingivalis</i>	0,052 µg/µL	1,82
<i>P.melaninogenica</i>	0,377 µg/µL	1,81
<i>P.intermedia</i>	0,292 µg/µL	1,78
<i>P.putida</i>	0,056 µg/µL	1,8
<i>S.aureus</i>	0,068 µg/µL	1,80
<i>S.constelatus</i>	0,657 µg/µL	2,0
<i>S.mutans</i>	0,087 µg/µL	1,91
<i>S.oralis</i>	0,158 µg/µL	1,99
<i>S.sanguinis</i>	1,457 µg/µL	1,92
<i>S.sobrinus</i>	0,466 µg/µL	1,95
<i>S.salivarius</i>	0,101 µg/µL	1,78
<i>S.parasanguinis</i>	0,249 µg/µL	1,88
<i>S.moreei</i>	0,149 µg/µL	1,8
<i>T.denticola</i>	0,096 µg/µL	1,9
<i>T.forsythensis</i>	1,549 µg/µL	1,88
<i>V.parvula</i>	0,308 µg/µL	1,82
<i>F.nucleatum</i>	0,219 µg/µL	1,85
<i>F.periodonticum</i>	0,012 µg/µL	2,0
<i>P.endodontalis</i>	0,116 µg/µL	1,7
<i>P.micros</i>	0,114 µg/µL	2,0
<i>N.mucosa</i>	0,221 µg/µL	2,0
<i>P.aeruginosa</i>	0,024 µg/µL	2,0
<i>S.gordonii</i>	0,180 µg/µL	1,93
<i>S.mitis</i>	0,165 µg/µL	2,0
<i>L.casei</i>	0,389 µg/µL	1,89
<i>S.pasteuri</i>	0,256 µg/µL	1,98

Avaliação da integridade dos DNAs genômicos em gel de agarose

A Figura 36 ilustra uma reação de eletroforese do DNA genômico de algumas espécies obtidos após o processo de extração. Após a corrente elétrica, os DNAs testados, por serem genômicos, ficaram posicionados próximos aos casulos de aplicação das amostras, acima do fragmento controle de maior peso molecular (23 Kb), demonstrando a integridade de suas cadeias de nucleotídeos. As amostras apresentaram uma pureza satisfatória, sem a presença de proteínas e/ou RNA.

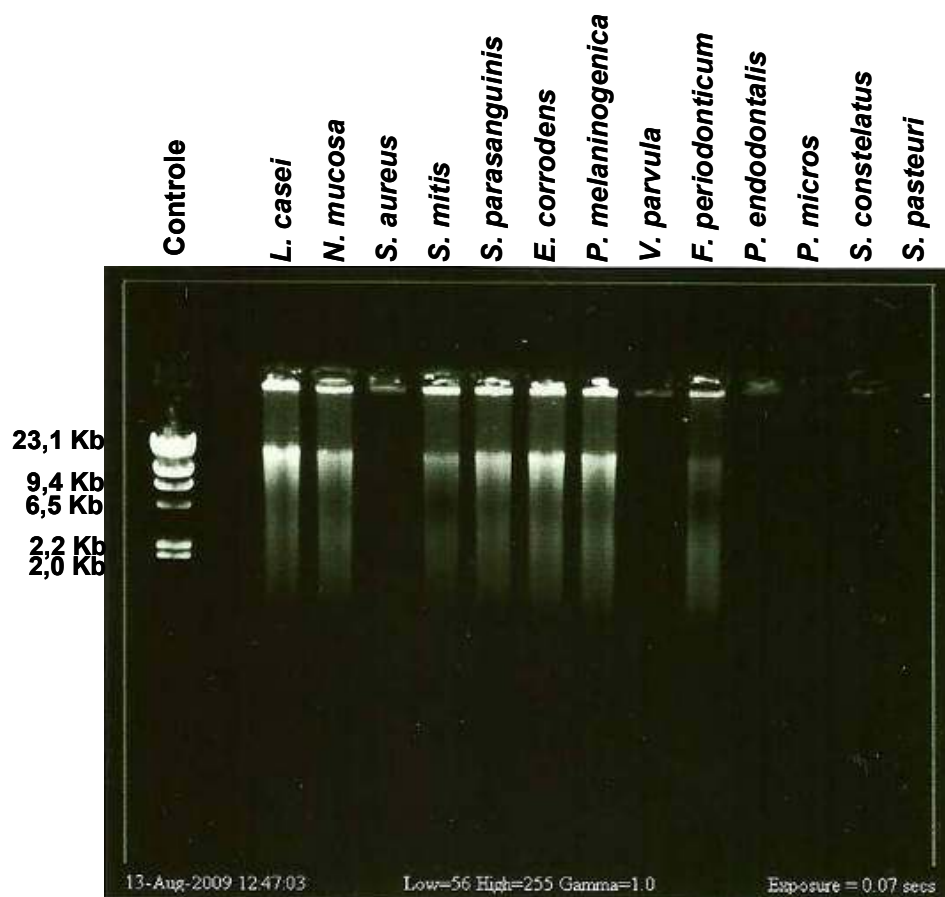


Figura 36 – Análise das amostras do DNA genômico de algumas espécies em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Cada raia contém 500 ng de DNA genômico. No alto da figura estão indicadas as espécies analisadas. Controle: marcador de peso molecular (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, o maior fragmento corresponde a 23,1 Kb).

Quantificação dos DNAs genômicos amplificados pelo 16S rDNA-based PCR

Na Tabela 4 estão representadas as concentrações e grau de pureza dos amplicons obtidos para cada espécie bacteriana após o procedimento de amplificação dos genes 16S rDNA dos DNAs genômicos pela técnica do 16S rDNA-based PCR e sua purificação.

Tabela 4 – Concentração e grau de pureza dos genes 16S rDNA das espécies estudadas obtidos após leitura em aparelho espectrofotômetro.

Espécie Bacteriana	Concentração []	Grau de Pureza 260/280
<i>Aa ATCC</i>	19,51 ng/μL	1,82
<i>Aa JP2</i>	30,33 ng/μL	1,80
<i>B.fragilllis</i>	37,20 ng/μL	1,70
<i>C.gingivalis</i>	32,01 ng/μL	1,70
<i>E.faecalis</i>	21,61 ng/μL	1,92
<i>E.corrodens</i>	34,48 ng/μL	1,70
<i>P.gingivalis</i>	22,69 ng/μL	1,60
<i>P.melaninogenica</i>	27,75 ng/μL	1,90
<i>P.itermedia</i>	13,88 ng/μL	1,60
<i>P.putida</i>	7,09 ng/μL	1,60
<i>S.aureus</i>	7,24 ng/μL	1,70
<i>S.constelatus</i>	10,02 ng/μL	1,80
<i>S.mutans</i>	10,39 ng/μL	1,82
<i>S.oralis</i>	28,73 ng/μL	1,98
<i>S.sanguinis</i>	8,12 ng/μL	1,80
<i>S.sobrinus</i>	25,57 ng/μL	1,70
<i>S.salivarius</i>	25,98 ng/μL	2,05
<i>S.parasanguinis</i>	47,37 ng/μL	2,03
<i>S.moreei</i>	46,76 ng/μL	2,04
<i>T.denticola</i>	28,67 ng/μL	2,30
<i>T.forsythensis</i>	40,80 ng/μL	2,00
<i>V.parvula</i>	8,27 ng/μL	1,60
<i>F.nucleatum</i>	10,12 ng/μL	1,70
<i>F.periodonticum</i>	17,84 ng/μL	1,60
<i>P.endodontalis</i>	11,31 ng/μL	1,70
<i>P.micros</i>	10,29 ng/μL	1,60
<i>N.mucosa</i>	35,99 ng/μL	1,60
<i>P.aeruginosa</i>	21,78 ng/μL	1,75
<i>S.gordonii</i>	15,98 ng/μL	1,80
<i>S.mitis</i>	12,34 ng/μL	1,93
<i>L.casei</i>	32,66 ng/μL	2,00
<i>S.pasteuri</i>	24,75 ng/μL	1,98
Controle Negativo	0,00 ng/μL	0,00

Avaliação dos amplicons em gel de agarose

A Figura 37 ilustra uma reação de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo, onde pode ser observado o comprimento dos amplicons provenientes da amplificação do gene 16S rDNA das bactérias pelo PCR. Os amplicons, quando comparados ao DNA controle, apresentam peso molecular de 1500 pb (pares de base). As amostras apresentaram uma pureza satisfatória, sem a presença de proteínas e/ou RNA.

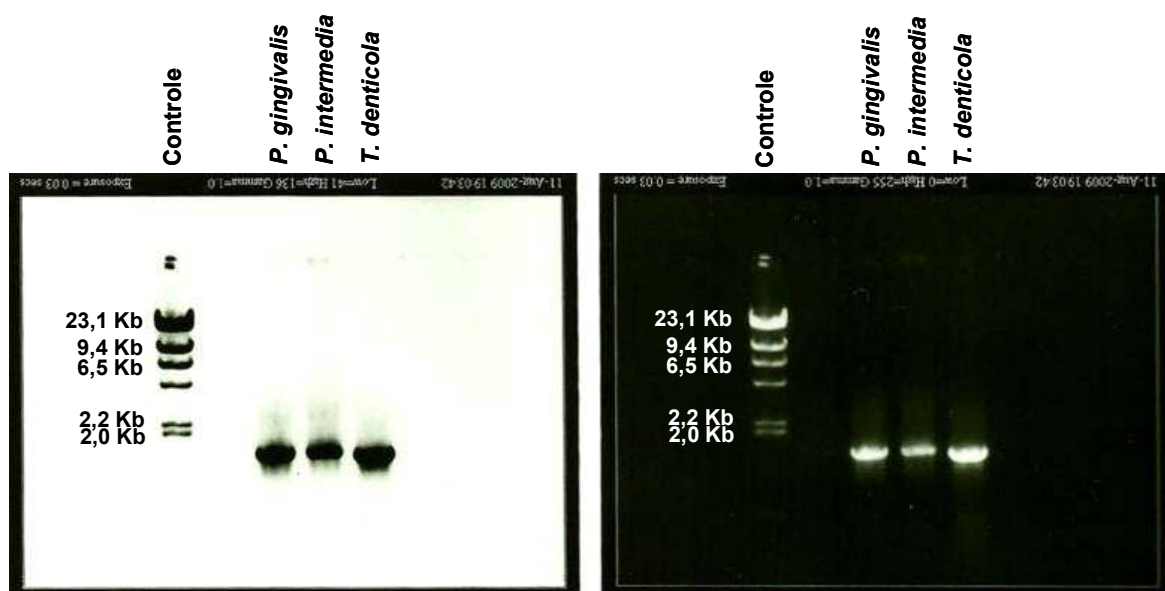


Figura 37 – Imagem positiva e negativa da análise das amostras dos genes 16S rDNA amplificados do DNA genômico de algumas espécies em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. Cada raia contém 1 µg de DNA amplificado. No alto da figura estão indicadas as espécies analisadas. Controle: marcador de peso molecular (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, o maior fragmento corresponde a 23,1 Kb).

Sequenciamento dos genes 16S rDNA

Todos os microrganismos cultivados para o estudo tiveram o seu DNA extraído submetido ao processo de sequenciamento do gene 16S rDNA para

confirmação. As espécies que foram contaminadas durante o processo de multiplicação e crescimento ou àquelas que não puderam ser confirmadas foram novamente cultivadas. Ao final, todas as espécies propostas foram confirmadas pelo sequenciamento. A Figura 38 exemplifica o resultado do sequenciamento de uma das espécies usadas.

Amostra 3_1492R_D01_009

```
NNCTCCTAAAAGNNTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCNCNNGGT
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTA
CAATCCGAAGTGAAGTGGCTTTAAGAGATTAGCTTGCCGTCACCGACTTG
CGACTCGTTGTACCAGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTATTACCGGCAG
TCTCGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAACATAAGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTCACCGATGTACCGAAGTAAACTCTATCTCTAGAGCGG
GCATCGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTCAA
CCTTGCGGTCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCA
CTAAGCCCCGAAAGGGCCTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGTTTTGAGCCTCAGCG
TCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTTCGCCACCGGTGTTCCCTCATATATC
TACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCTCTCCCCTTCTGCACTCAA
GTTAAACAGTTTCCAAAGCGTACTATGGTTAAGCCACAGCCTTTAACTTCAN
ACTTATCTAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGC
TCGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCTT
TNTGGTAAGATACCGTCACANN
```

Resultado após comparação com base de dados:

AB355604.1 *Streptococcus gordonii* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: NY126 1784 (Semelhança: 99%)

AB355603.1 *Streptococcus gordonii* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: NJ122 1784 (Semelhança: 99%)

Figura 38 – Exemplo da leitura de sequenciamento genético de uma amostra de DNA amplificado pelo 16S rDNA-based PCR. A sequência de nucleotídeos obtida foi comparada ao banco de dados do U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health, confirmando o DNA da espécie selecionada.

Amplificação do DNA genômico das espécies pelo MDA

Quantificação dos DNAs

A Figura 39 representa os valores do DNA controle (λ) diluído em solução tampão TE (1X) para obtenção dos valores de referência da curva controle e a equação gráfica para a quantificação do DNA amplificado.

Curva Controle (λ DNA)	(λ DNA) 10ng	(λ DNA) 10ng/ μ L	1XTE	Concentração []	Análise da Fluorescência
1	600	60 μ L	40 μ L	6ng/ μ L	3361
2	500	50 μ L	50 μ L	5ng/ μ L	3241
3	400	40 μ L	60 μ L	4ng/ μ L	3001
4	200	20 μ L	80 μ L	2ng/ μ L	2054
5	100	10 μ L	90 μ L	1ng/ μ L	1142
6	50	5 μ L	95 μ L	500pg/ μ L	510
7	25	2.5 μ L	97.5 μ L	250pg/ μ L	249
8	0	0 μ L	100 μ L	0	0

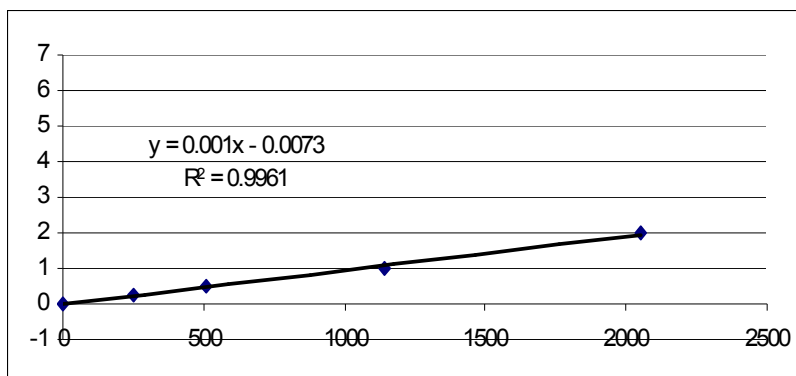


Figura 39 – Curva controle e Equação gráfica para o cálculo da concentração dos DNAs amplificados pelo MDA.

Na Tabela 5 estão dispostos os valores das concentrações dos DNAs amplificados, gerados pela equação gráfica obtida pela curva controle após leitura em aparelho Espectrofluorímetro.

Tabela 5 – DNA genômico amplificado, valores da leitura em aparelho espectrofluorímetro e suas respectivas concentrações.

DNA Amplificado #	Espécie	Análise da Fluorescência	Concentração (Gráfico)	
1	<i>L. casei</i>	0	0	ng/μL
2	<i>N. mucosa</i>	2535	2,52	ng/μL
3	<i>S. aureus</i>	2298	2,29	ng/μL
4	<i>S. mitis</i>	270	0,26	ng/μL
5	<i>S. parasanguinis</i>	2010	2,00	ng/μL
6	<i>E. corrodens</i>	2343	2,33	ng/μL
7	<i>P. melaninogenica</i>	2598	2,59	ng/μL
8	<i>V. parvula</i>	2372	2,36	ng/μL
9	<i>F. periodonticum</i>	189	0,18	ng/μL
10	<i>P. endodontalis</i>	2016	2,00	ng/μL
11	<i>P. micros</i>	0	0	ng/μL
12	<i>S. constelatus</i>	0	0	ng/μL

Análise dos DNAs amplificados em Gel de Agarose

A Figura 40 ilustra a análise em gel de agarose, após eletroforese, de amostras de DNA amplificados pelo MDA. As amostras (DNA genômico) ficaram posicionadas acima do controle de maior peso molecular, demonstrando a integridade de suas cadeias de nucleotídeos após a amplificação. As amostras apresentaram uma pureza satisfatória, sem a presença de proteínas e/ou RNA.



Figura 40 – Análise das amostras do DNA genômico amplificado de algumas espécies em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Cada raia contém 2 µg de DNA genômico. No alto da figura estão indicadas as espécies analisadas. Controle: marcador de peso molecular (DNA genômico de fago lambda digerido com Hind III, o maior fragmento corresponde a 23,1 Kb).

Resultados do teste de sensibilidade e especificidade das sondas marcadas

A Figura 41 mostra o resultado do teste de hibridização de quantidades padronizadas das sondas cruzadas contra quantidades definidas do DNA (10^5 ou 10^6 células) usado para marcar as sondas de algumas espécies usadas no estudo. As sondas apresentaram especificidade adequada, reagindo somente com o DNA controle da mesma espécie. As sondas que apresentaram uma baixa intensidade de marcação no teste de padronização (Exemplo: *Streptococcus spp.* na figura 41) foram ajustadas para uma concentração maior, aumentando a sensibilidade da reação sem perder a especificidade.

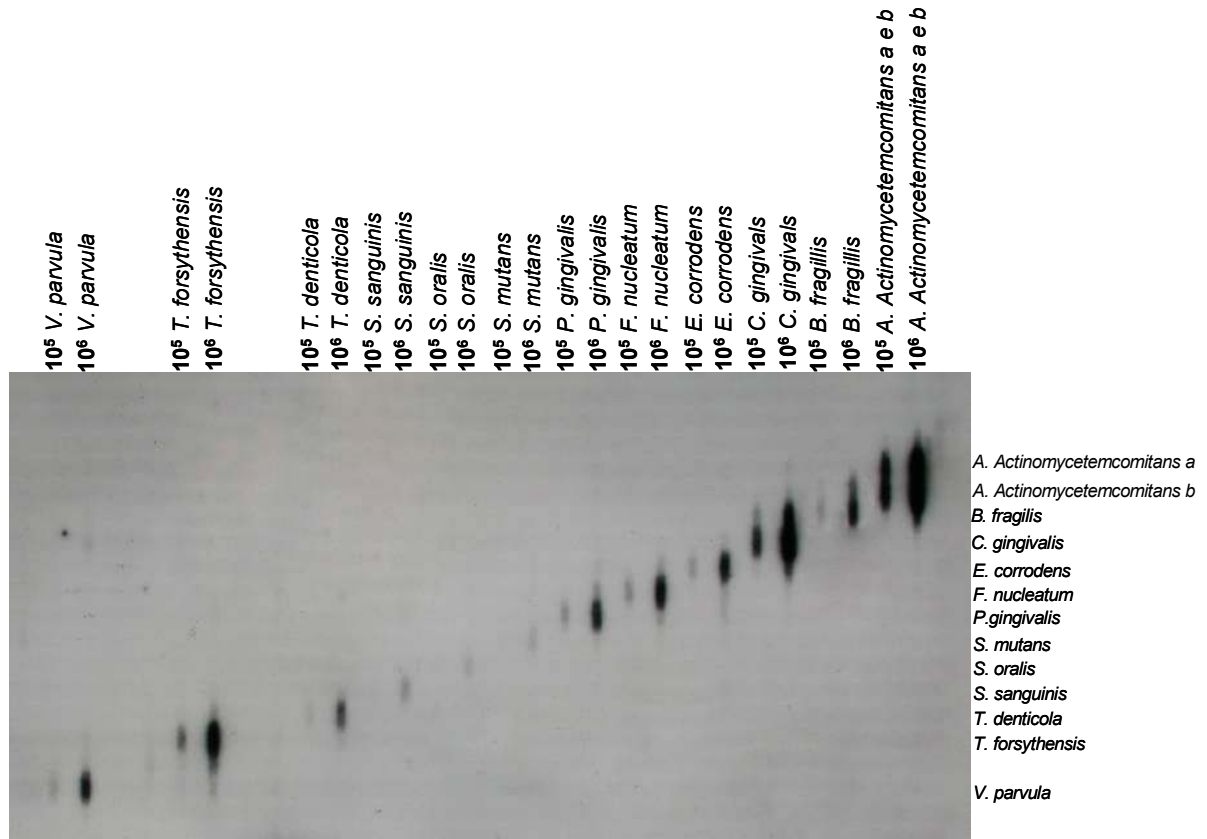


Figura 41 – Teste de hibridização demonstrando a sensibilidade e especificidade das sondas após reação de marcação. Vertical: representa o controle, com células alvo das espécies testadas nas quantidades de 10^5 e 10^6 células. Horizontal: sondas marcadas com o mesmo DNA usado no controle.

Avaliação da passagem bacteriana através da interface implante-conector

As amostras coletadas do interior dos implantes previamente ao teste de infiltração, e usadas como controle negativo para a contaminação dos implantes pela saliva, não apresentaram sinais de hibridização positivos para nenhuma espécie avaliada, confirmando que não havia a presença de microrganismos no interior dos implantes antes dos testes estático e de carga.

Todos os tipos de conexões avaliadas (Hexágono Externo, Hexágono Interno e Cone Morse) do sistema de implantes avaliado neste estudo apresentaram sinais de passagem de bactérias através da interface implante-conector protético. A Tabela 6 representa os resultados das amostras avaliadas em relação à passagem de espécies bacterianas pela interface.

Tabela 6 - Número de conjuntos avaliados em cada grupo e conjuntos onde houve a passagem de microrganismos pela interface implante-conector protético.

Amostra	Grupo 1 (Hexágono Externo)		Grupo 2 (Hexágono Interno)		Grupo 3 (Cone Morse)	
	Controle	Carga	Controle	Carga	Controle	Carga
1	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	-	+
4	-	+	-	+	-	+
5	-	+	-	+	+	-
6	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+
8	-	+	-	+	-	+
9	-	+	-	+	-	+
10	-	+	-	+	-	+

+: Representa a detecção de espécies abrigando o interior dos implantes

-: Ausência de detecção de espécies abrigando o interior dos implantes

Comparando-se os tipos de conexões nos grupos controles, a frequência de contaminação dos conjuntos foi maior nos implantes de hexágono externo e interno do que nos de cone morse ($p < 0,01$), sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Não houve diferenças significantes entre os 3 tipos de conexões com relação à frequência de contaminação dos conjuntos avaliados quando os implantes foram submetidos à carga cíclica ($p > 0,05$). Todos os tipos de conexões

avaliados apresentaram maior frequência de contaminação nos conjuntos submetidos à ciclagem de carga quando comparados aos seus controles estáticos ($p < 0,01$).

5.3 Quantificação da contaminação bacteriana pelo DNA-Checkerboard

As Figuras 42, 43 e 44 ilustram a reação de hibridização das membranas contendo as amostras dos implantes dos 3 tipos de conexão avaliados, com e sem a aplicação de carga cíclica.

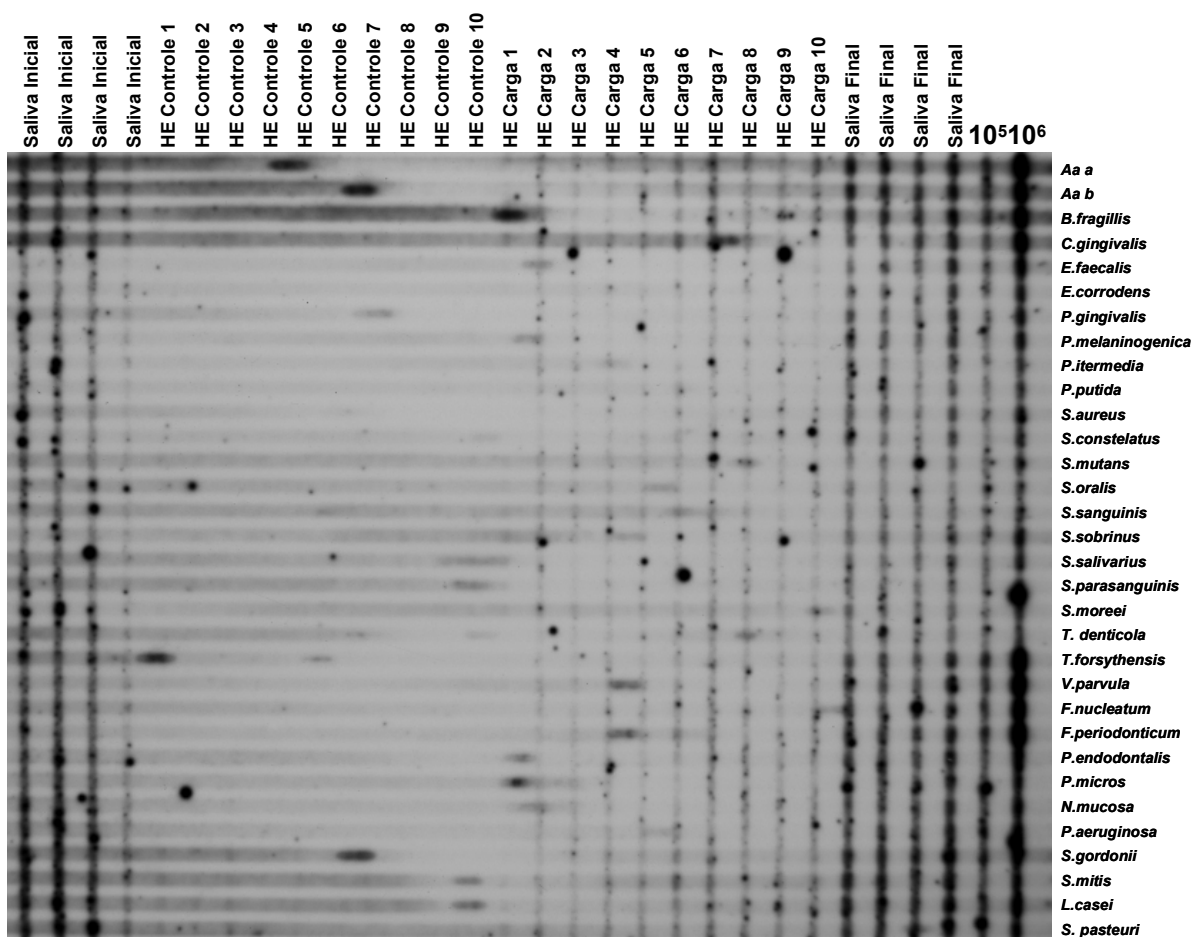


Figura 42 – Reação de hibridização das amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes do grupo Hexágono Externo submetidos ou não à ciclagem de carga. As linhas verticais representam as amostras e controles (10^5 e 10^6), e as linhas horizontais as sondas das 32 espécies bacterianas avaliadas.

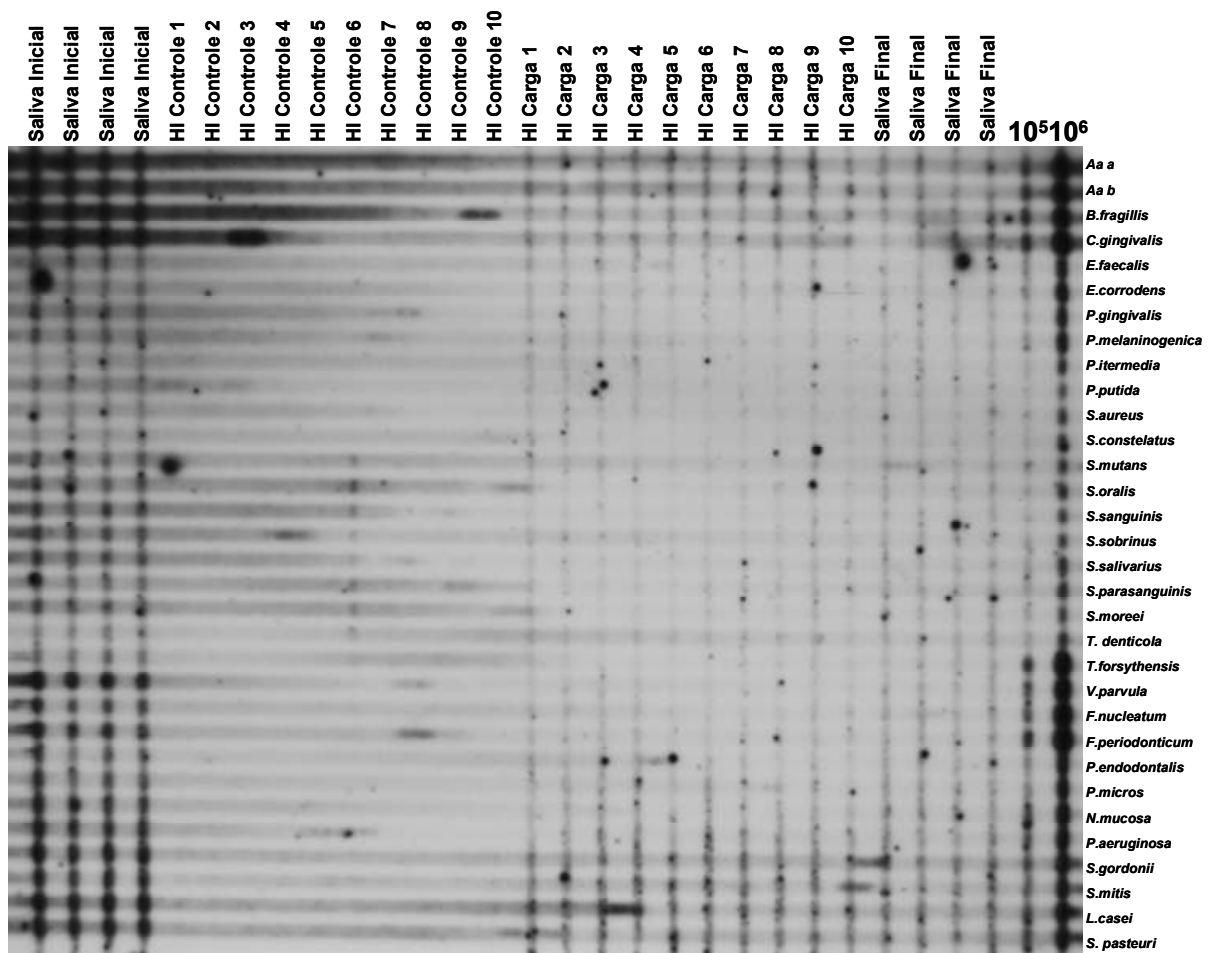


Figura 43 – Reação de hibridização das amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes do grupo Hexágono Interno submetidos ou não à ciclagem de carga. As linhas verticais representam as amostras e controles (10^5 e 10^6), e as linhas horizontais as sondas das 32 espécies bacterianas avaliadas.

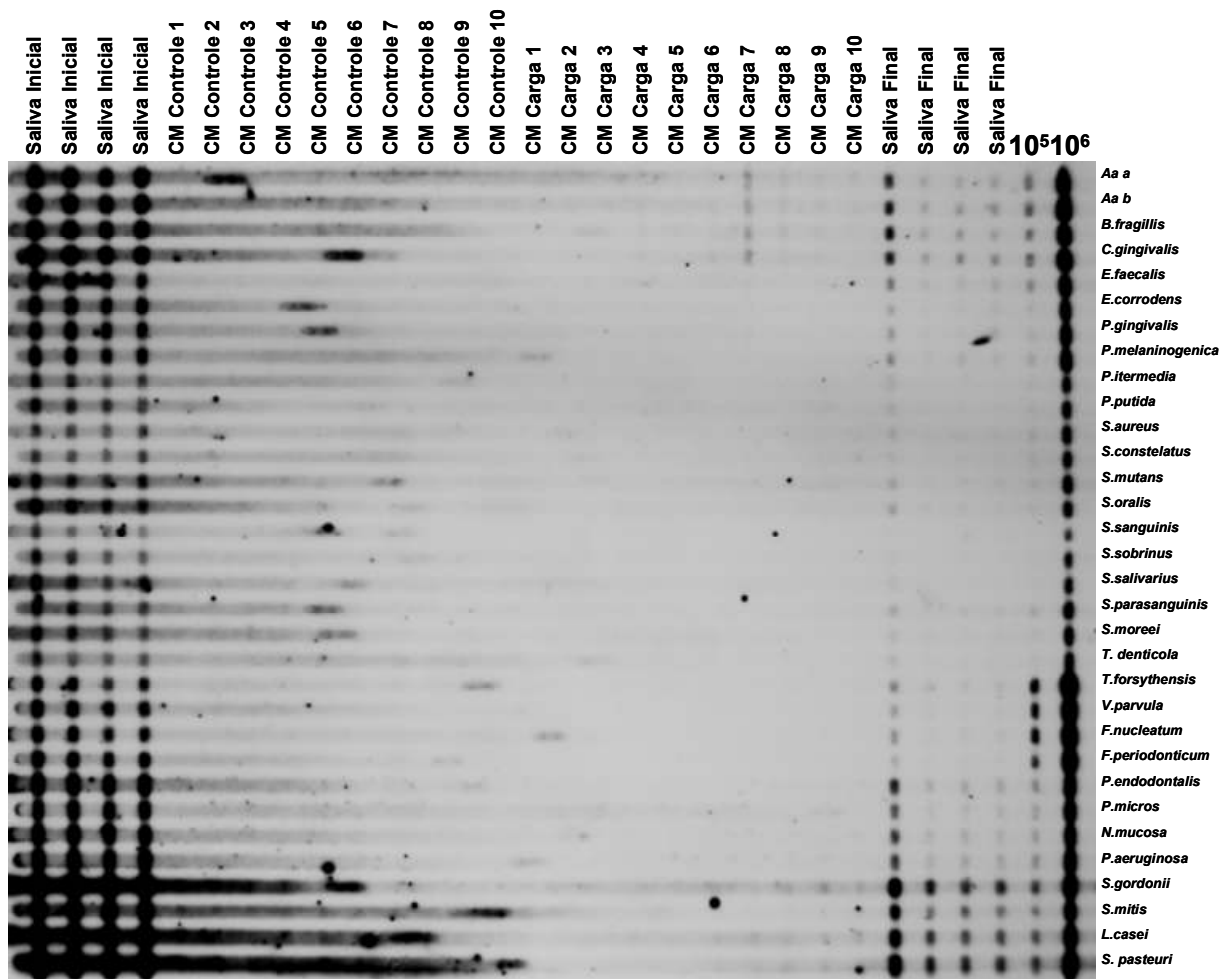


Figura 44 – Reação de hibridização das amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes do grupo Hexágono Externo submetidos ou não à ciclagem de carga. As linhas verticais representam as amostras e controles (10^5 e 10^6), e as linhas horizontais as sondas das 32 espécies bacterianas avaliadas.

A média da contagem bacteriana ($\times 10^5$, \pm EPM) das 32 espécies avaliadas nas amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes de conexão do tipo hexágono externo (HE), hexágono interno (HI) e cone morse (CM), submetidos ou não à aplicação de carga cíclica, estão dispostos nas Figuras 45 e 46.

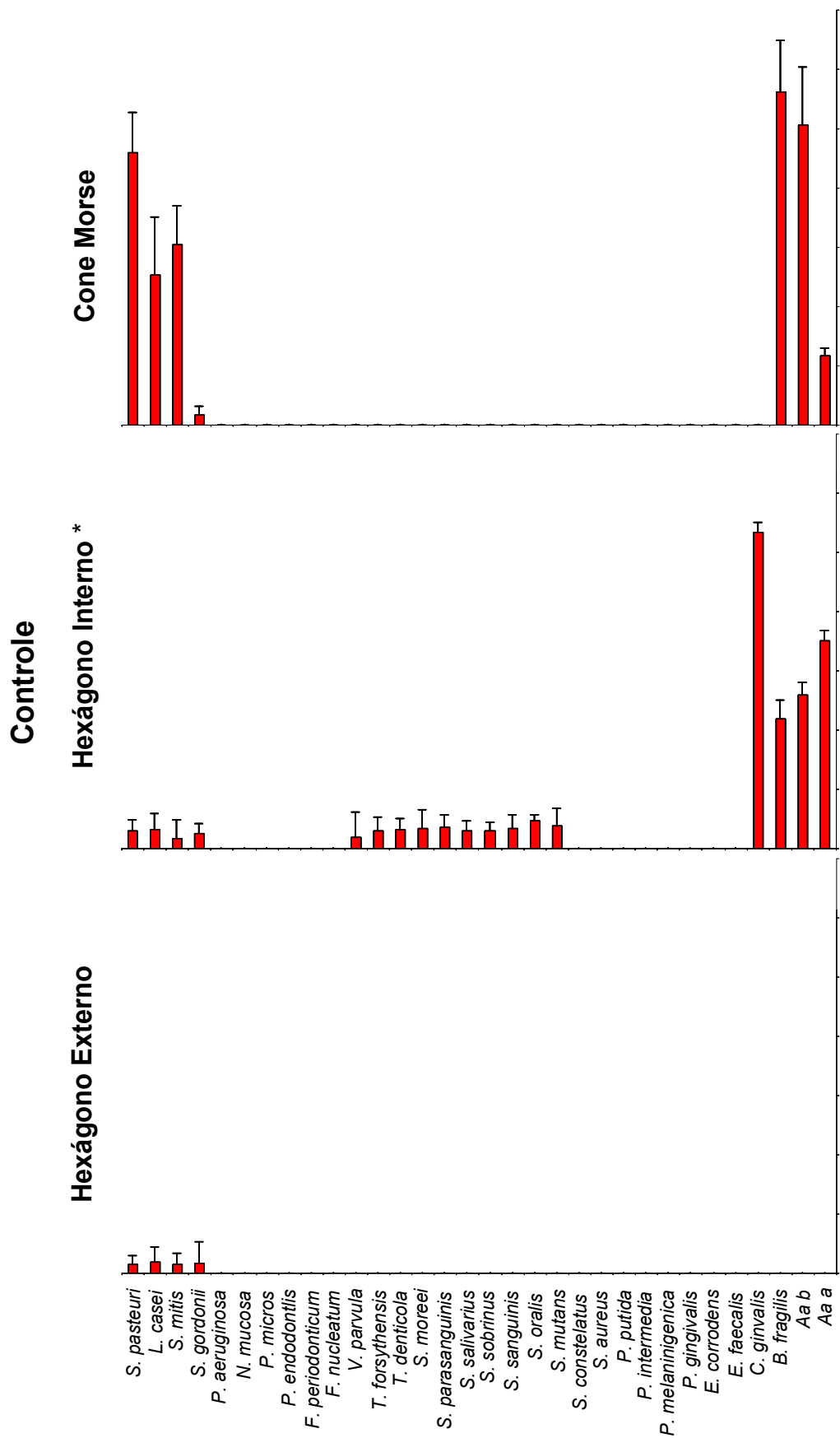


Figura 45 - Gráfico da contagem de células bacterianas ($\times 10^5$, \pm EPM) de cada espécie avaliada nas amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes de hexágono externo, interno e cone morse não submetidos à ciclagem de carga. (*Diferenças significantes entre as contagens detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$ para o grupo hexágono interno).

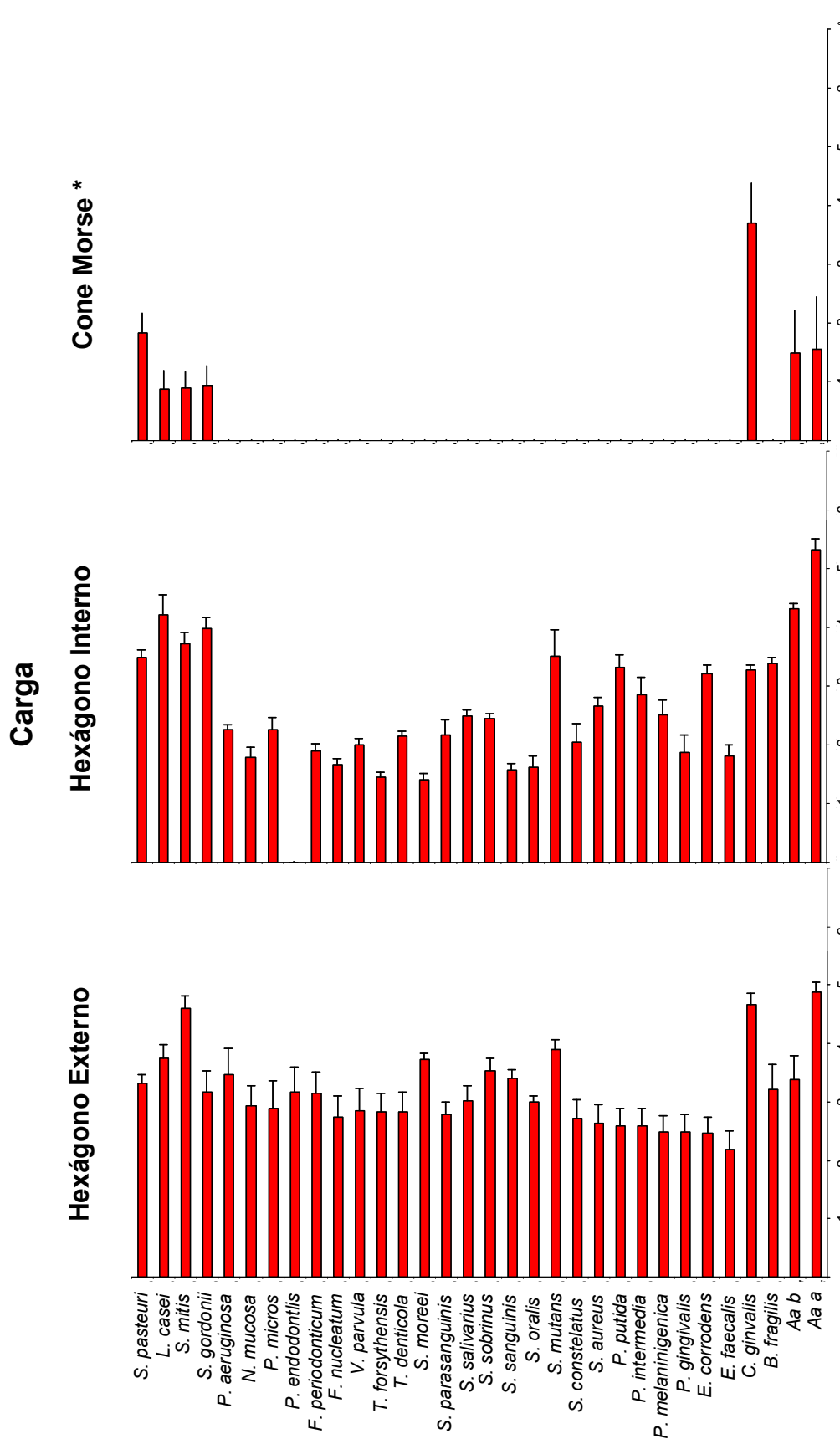


Figura 46 - Gráfico da contagem de células bacterianas (x10⁵, ±EPM) de cada espécie avaliada nas amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes de hexágono externo, interno e cone morse submetidos à ciclagem de carga (*Diferenças significantes entre as contagens detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p<0,001 para o grupo cone morse).

O grupo do hexágono interno apresentou os maiores valores de contagem de bactérias quando comparado ao hexágono externo e cone morse nos grupos que não foram submetidos à aplicação de carga cíclica ($p < 0,001$ e $p > 0,05$, respectivamente). Quando as amostras foram submetidas à ciclagem de carga, os implantes de hexágono externo e interno apresentaram as maiores contagens de espécies bacterianas quando comparados ao cone morse ($p < 0,001$), sem diferenças significantes entre si ($p > 0,05$). Quando as amostras do grupo controle foram comparadas às amostras submetidas à aplicação de carga, os implantes de hexágono externo e interno submetidos à ciclagem de carga apresentaram uma maior contagem de espécies bacterianas do que seus controles ($p < 0,001$). Os implantes cone morse não apresentaram diferenças significantes com relação à contagem bacteriana entre as amostras submetidas à ciclagem de carga e os controles ($p > 0,05$). As maiores contagens bacterianas ($\times 10^5$, \pm EMP) para as amostras provenientes dos grupos controles e submetidos à carga foram, respectivamente, *L. casei* ($0,19 \pm 0,31$) e *A. actinomycetemcomitans* ($4,88 \pm 0,18$) para os implantes de hexágono externo; *C. gingivalis* ($5,33 \pm 0,65$) e *A. actinomycetemcomitans* ($4,88 \pm 0,18$) para os implantes de hexágono interno; e *B. fragillilis* ($5,61 \pm 1,61$) e *C. gingivalis* ($3,71 \pm 2,49$) para os implantes de cone morse ($p < 0,05$).

As amostras de saliva coletadas antes do ensaio de carga cíclica apresentaram diferenças significantes em relação à contagem de microrganismos quando comparadas às amostras de saliva coletadas após o ensaio ($p < 0,0001$),

mas não apresentaram diferenças em relação à incidência das espécies ($p > 0,05$ – Figura 47 e 48).

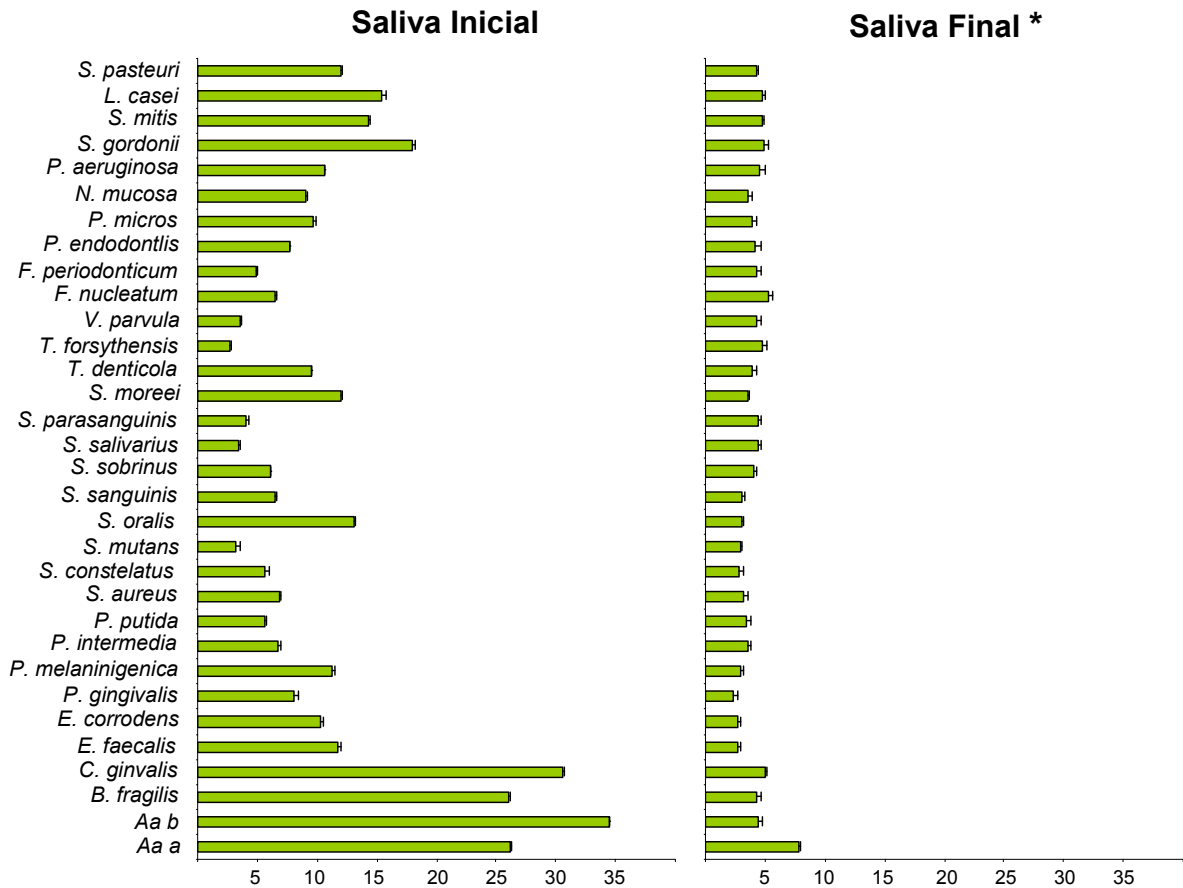


Figura 47 - Gráfico da contagem de células bacterianas ($\times 10^5$, \pm EPM) de cada espécie avaliada nas amostras de saliva antes e após o ensaio de ciclagem de carga. (*Diferenças significantes detectadas pelo teste de Mann-Whitney; $p < 0,0001$).

Quando comparadas aos grupos controles, as amostras da saliva apresentaram maiores contagens bacterianas do que todos os sistemas de conexão testados ($p < 0,001$). Em relação aos implantes submetidos à ciclagem de carga, as amostras de hexágono externo e interno apresentaram as maiores contagens e não mostraram diferenças significantes para a saliva ($p > 0,05$), diferentemente dos implantes cone morse ($p < 0,01$).

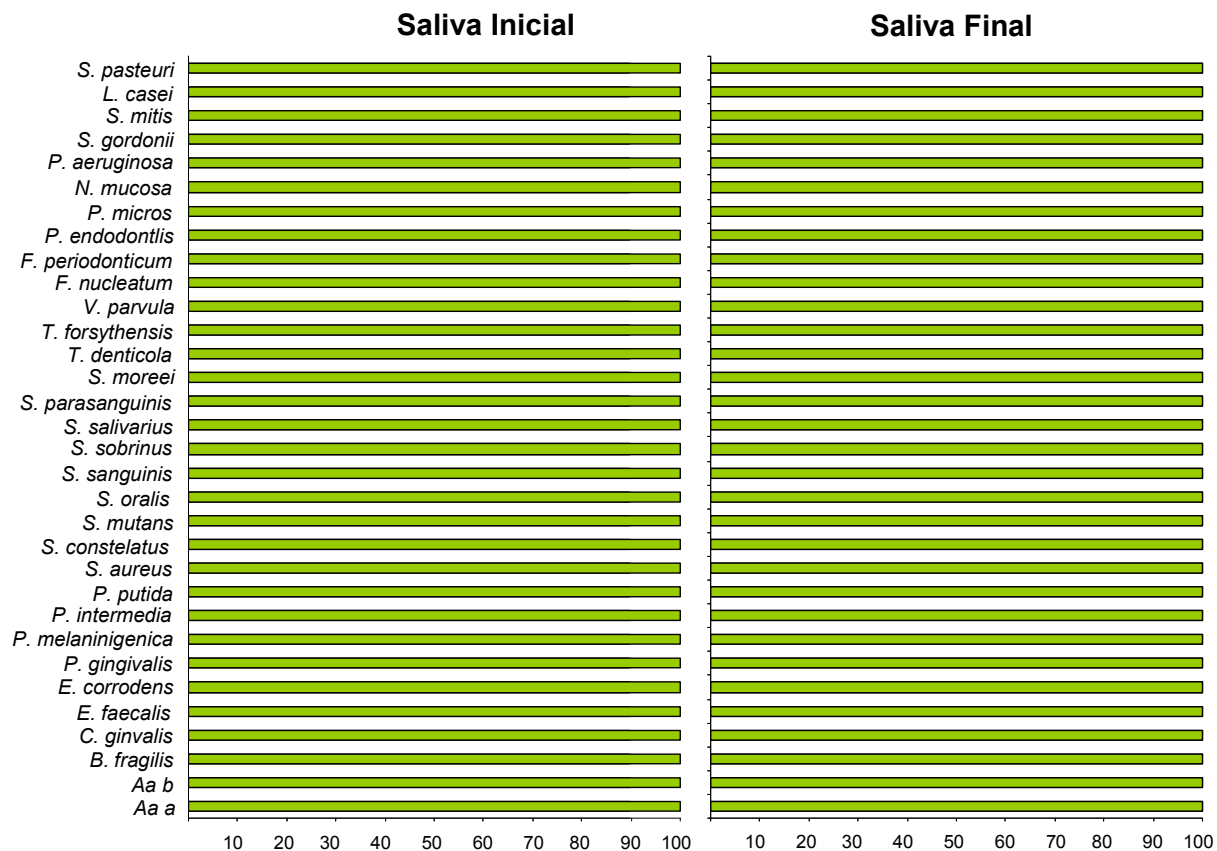


Figura 48 - Gráfico da incidência (porcentagem) de cada espécie bacteriana avaliada nas amostras coletadas da saliva antes e após o uso no ensaio de carga.

As amostras provenientes dos grupos controles de todos os tipos de conexões avaliadas não apresentaram diferenças significantes quanto à incidência de bactérias quando comparadas à saliva ($p < 0,001$). Já nos implantes submetidos à carga cíclica, a incidência foi maior no hexágono externo e interno, sem diferenças para a saliva ($p > 0,05$).

A média da porcentagem de implantes com conexão do tipo hexagonal externa, interna ou cone morse colonizados pelas 32 espécies bacterianas avaliadas, quando foram submetidos ou não à carga cíclica, estão sumarizados nas Figuras 49 e 50.

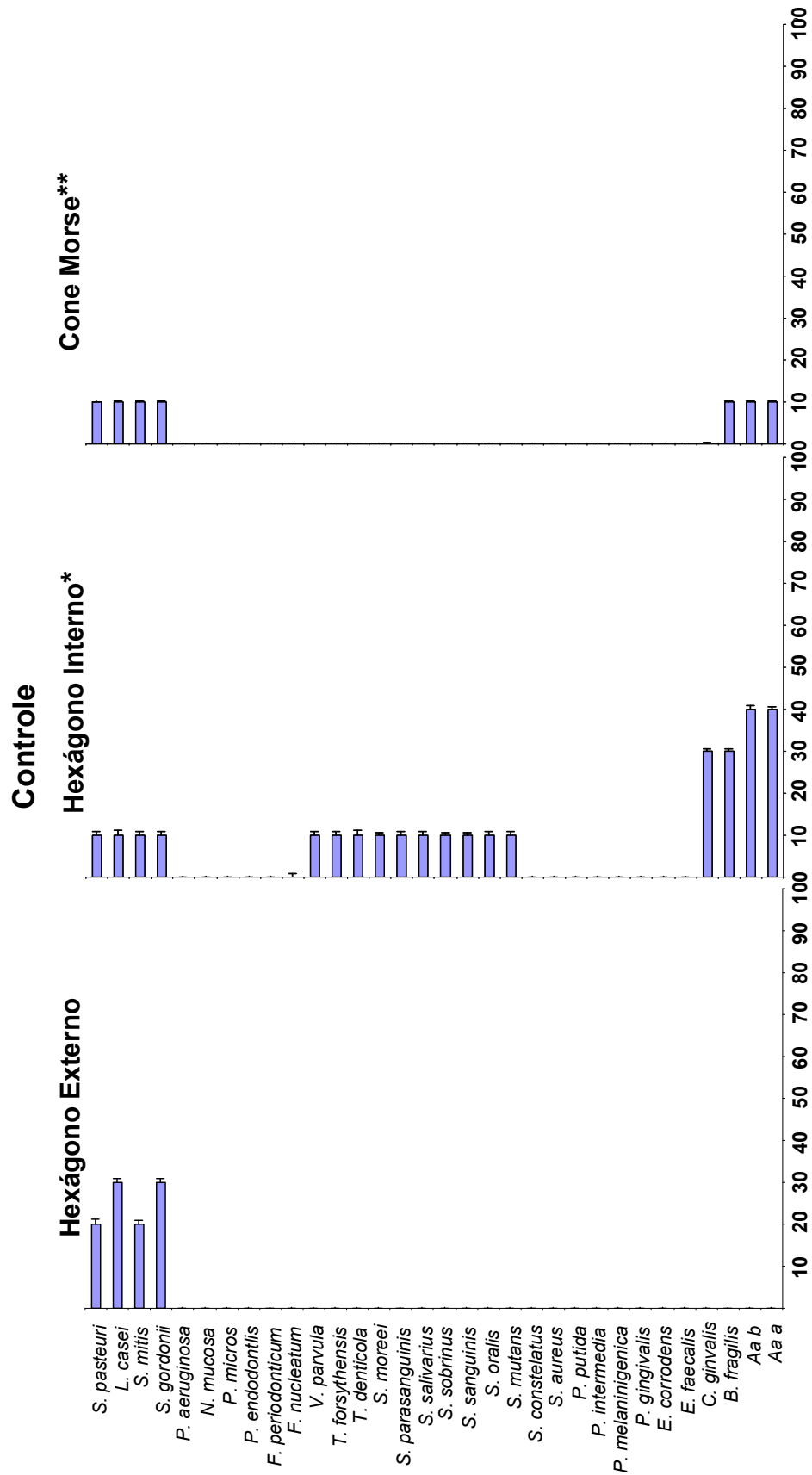


Figura 49 - Gráfico da incidência (porcentagem de conjuntos colonizados) de cada espécie avaliada nas amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes de hexágono externo, interno e conce morse não submetidos à ciclagem de carga (*Diferenças significantes detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis, p<0,001 para o grupo HI; **Diferenças significantes detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p<0,05 para o grupo Cone Morse).

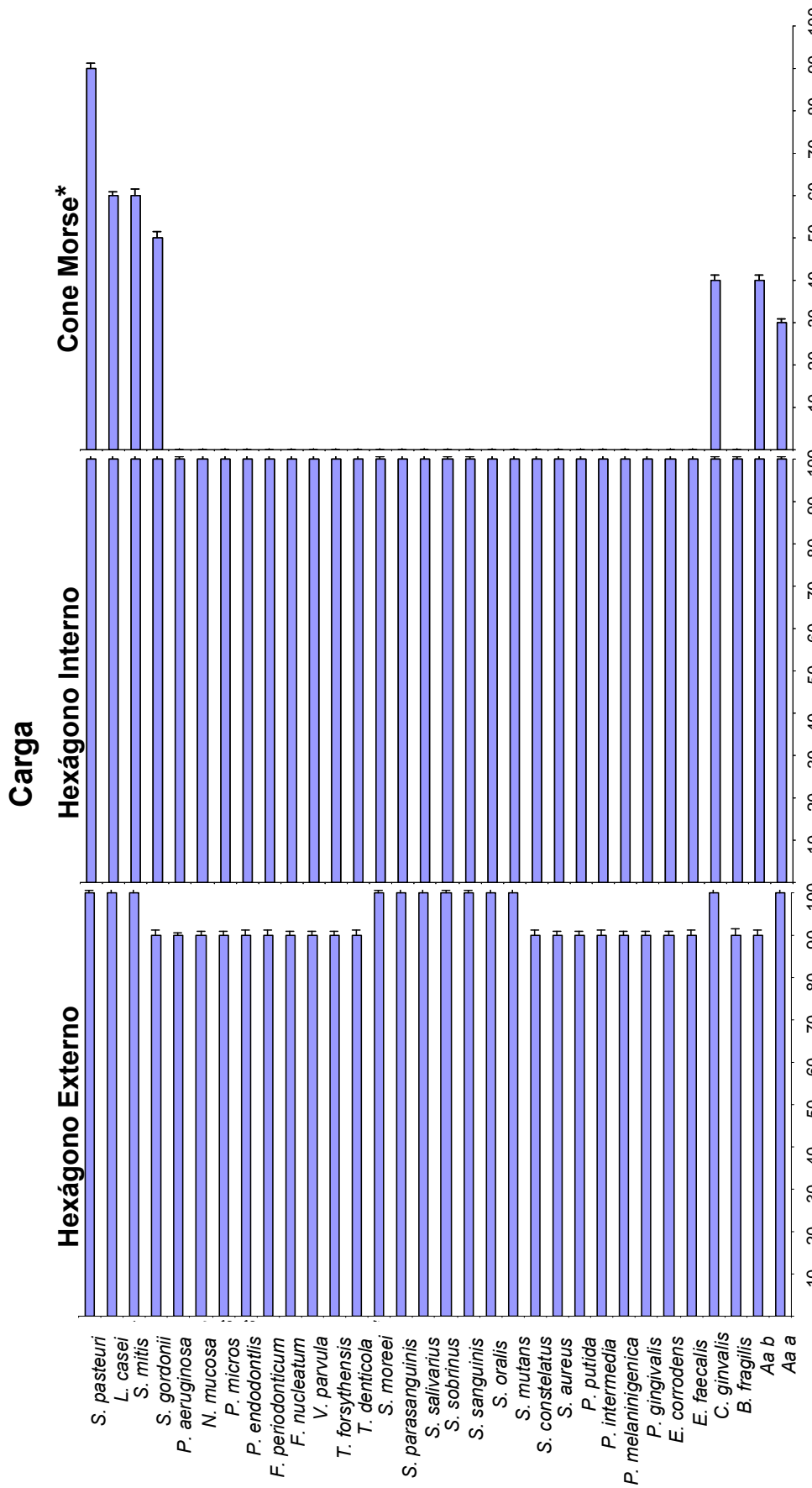


Figura 50 - Gráfico da incidência (porcentagem de conjuntos colonizados) de cada espécie avaliada nas amostras provenientes dos parafusos dos conectores e interior dos implantes de hexágono externo, interno e cone morse submetidos à ciclagem de carga (*Diferenças significativas entre as contagens detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis; p<0,001 para o grupo cone morse).

Os diferentes tipos de conexões apresentaram diferenças significantes em relação à incidência das espécies quando não foram submetidos à aplicação de carga cíclica ($p > 0,05$ para o cone morse; $p < 0,001$ para o hexágono interno). Das amostras submetidas à ciclagem de carga, os implantes de hexágono externo e interno apresentaram as maiores incidências de espécies bacterianas quando comparados ao cone morse ($p < 0,001$), sem diferenças significantes entre si ($p > 0,05$). Quando as amostras do grupo controle foram comparadas às amostras submetidas à aplicação de carga, os implantes de hexágono externo e interno submetidos à ciclagem de carga apresentaram uma maior incidência de espécies bacterianas do que seus controles ($p < 0,001$). Os implantes cone morse não apresentaram diferenças significantes entre as amostras submetidas à ciclagem de carga e os controles ($p > 0,05$). O microrganismo *S. pasteurii* foi a espécie mais incidente em todos os tipos de conexões avaliadas, quando submetidas à ciclagem de carga, ocorrendo em 100% das amostras de hexágono externo e interno, e em 90% das amostras de cone morse. Nas amostras controle, as maiores incidências foram para *S. gordonii* (30%) e *L. casei* (30%) para o hexágono externo, e *A. actinomycetemcomitans a* (40%) e *A. actinomycetemcomitans b* (40%) para o hexágono interno. Todas as 7 espécies detectadas no grupo cone morse apresentaram uma incidência de 10%.

6. DISCUSSÃO

Vários estudos sobre a microbiota presente ao redor de implantes odontológicos têm sido publicados, alguns dos quais referentes à presença de possíveis patógenos periodontais colonizando o sulco peri-implantar de implantes que falharam (LEONHARDT et al. 1999; SHIBLI et al. 2007; CALLAN et al. 2005; COSYN et al. 2009). O sucesso primário dos implantes deve-se a sua adequada integração ao tecido ósseo de suporte (BRANEMARK et al., 1969). No entanto, caso não exista uma perfeita adaptação entre o implante e seus componentes protéticos, a área torna-se susceptível à colonização bacteriana, favorecendo o desenvolvimento de processos infecciosos na mucosa peri-implantar e comprometendo o estabelecimento e a manutenção da osseointegração (JANSEN et al., 1997; MOMBELLI et al., 2001).

Poucos trabalhos de investigação *in vitro*, utilizando implantes de sistemas nacionais, são descritos na literatura relatando a infiltração bacteriana pela interface entre implantes e conectores protéticos submetidos à simulação de carga cíclica. Considerando as falhas de adaptação inerentes aos sistemas de implantes de 2 componentes, principalmente em condições de simulação de fadiga mecânica onde os espaços apresentam-se aumentados, e a possibilidade da colonização bacteriana destes espaços também aumenta, julgamos relevante avaliar e comparar por meio da técnica de hibridização DNA Checkerboard, a passagem de bactérias presentes na saliva humana através da interface entre implante e conectores protéticos com conexões do tipo hexagonal externa, interna e cone morse, submetidos ou não à simulação de carga cíclica em um modelo experimental *in vitro*.

Os resultados obtidos indicam a ocorrência de infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético em todos os tipos de conexões avaliadas, tanto para os grupos submetidos à ciclagem de carga quanto para os grupos avaliados de forma estática (controle). A diferença entre as contagens médias e a incidência de espécies encontradas nos conjuntos dos 3 tipos de conexões avaliados, submetidos ou não à carga cíclica, foi altamente significativa ($p < 0,0001$). Em ambas as condições experimentais, os componentes de conexão do tipo cone morse apresentaram menores contagens de bactérias quando comparados aos demais componentes. Os implantes submetidos à ciclagem de carga apresentaram uma maior contagem e incidência de bactérias do que os implantes que foram avaliados de forma estática.

A presença de bactérias abrigando o interior dos implantes de 2 componentes era esperada, uma vez que o tamanho médio das espécies bacterianas que abrigam a cavidade oral varia entre 1,1 a 1,5 μm de diâmetro e de 2 a 6 μm de comprimento, e os valores médios das desadaptações entre os componentes descritos na literatura variam entre 1 a 100 μm (BINON et al. 1996). É importante salientar ainda que na cavidade oral são encontrados microrganismos menores, como as espiroquetas, cujo diâmetro médio varia de 0,1 a 0,5 μm (JANSEN et al. 1997).

Os resultados da presente investigação estão de acordo com vários estudos recentes, que também demonstraram, de forma *in vitro* e sem a aplicação de carga cíclica, a ocorrência de infiltração bacteriana tanto do meio externo para o interior dos implantes quanto no sentido inverso (PROFF et al. 2006; DUARTE et

al. 2006; NASCIMENTO et al. 2008; NASCIMENTO et al. 2009; BARBOSA et al. 2009; ALOISE et al. 2010). Esses resultados também são semelhantes aos encontrados em outros estudos *in vitro*, nos quais a simulação de carga cíclica produziu maior frequência e quantidade de contaminação (STEINEBRUNNER et al. 2005; PAUTKE et al. 2009). Por outro lado, a presença de espécies bacterianas abrigando o interior dos implantes de 2 componentes após alguns anos em função também foi confirmada em alguns estudos *in vivo* (RIMONDINI et al. 2001; CALLAN et al. 2005; COSYN et al. 2009).

A maioria dos estudos *in vitro* avaliando a passagem de bactérias através da interface implante-conector protético de forma estática apresentou altos índices de contaminação dos espécimes avaliados, em alguns casos até mesmo 24 horas antes do período de incubação, indicando a ocorrência de falhas na adaptação dos componentes (PROFF et al. 2006; DUARTE et al. 2006; NASCIMENTO et al. 2009). Apesar do uso de conectores protéticos pré-fabricados, onde se espera uma maior precisão de adaptação dos componentes, nosso estudo mostrou uma alta taxa de contaminação para os grupos com conexão hexagonal externa e interna, com 30% e 40% respectivamente, de conjuntos contaminados nos grupos controles. Jansen et al. (1997) mostraram que até mesmo sistemas de implantes com um alto grau de precisão na adaptação marginal entre os componentes não puderam prevenir completamente a penetração bacteriana e a colonização dos implantes. Segundo esses autores, a infiltração bacteriana em implantes de conexão interna e externa não difere significativamente.

A força final do torque utilizada para a adaptação dos componentes aos implantes está diretamente relacionada à precisão final de adaptação e ao grau de

infiltração bacteriana através dos espaços. Gross et al., em 1999, estudaram o grau de micro-infiltração na interface implante-conector protético variando os níveis de torque em 5 sistemas de implantes. A micro-infiltração na interface ocorreu em todos os sistemas, variando de acordo com a marca e o torque aplicado. Conforme o torque aumentou de 10 Ncm para 20 Ncm, e até o recomendado pelo fabricante, a micro-infiltração diminuiu significativamente para todos os sistemas. Desta forma, presumivelmente, fluidos contendo produtos bacterianos e nutrientes necessários para o crescimento bacteriano podem passar através da interface quando são aplicados torques menores que os recomendados pelo fabricante, contribuindo em parte pelo mau odor e comprometimento dos tecidos peri-implantares. O torque final recomendado pelo fabricante nos conectores protéticos usados neste estudo foi de 20 Ncm. É plausível que torques mais elevados pudessem reduzir a infiltração bacteriana pela interface implante-conector. Entretanto, esses torques poderiam também afetar as propriedades mecânicas dos parafusos utilizados nas conexões e das roscas internas dos implantes, e por este motivo não foram testados neste estudo. Novos estudos utilizando este mesmo modelo experimental mas com parafusos que resistam a valores de torque mais elevados podem contribuir na avaliação da influência do torque nos níveis de infiltração bacteriana.

Modificações das superfícies dos implantes e componentes buscando um melhor selamento marginal, assim como o uso de materiais seladores, são outras alternativas que podem ser melhor investigadas para minimizar a infiltração bacteriana através da interface implante-conector. Alguns estudos foram propostos com este objetivo e mostraram-se úteis na redução da contaminação,

porém, não impediram totalmente a passagem dos microrganismos pela interface (STEINEBRUNNER et al. 2005; PROFF et al. 2006).

Durante o tratamento com implantes de duas partes, inevitavelmente, os componentes são parafusados diversas vezes até a finalização das próteses. O apertamento repetido dos parafusos de fixação dos conectores protéticos tem mostrado uma redução progressiva na força do torque de retenção dos mesmos (WEISS et al. 2000). Byrne et al. (2006) demonstraram uma redução na pré-carga dos parafusos de fixação dos conectores quando apertado repetidas vezes, independentemente do tipo de conexão dos implantes e torque de inserção utilizados. Em outro estudo *in vitro*, em que se demonstrou um grande percentual de contaminação, foram utilizadas várias associações de implantes e os conjuntos foram reabertos várias vezes durante o período experimental (JANSEN et al., 1997). Recentemente, em um estudo semelhante, observamos uma maior quantidade de microrganismos abrigoando o interior de implantes com conexão hexagonal externa onde os parafusos de fixação dos conectores protéticos foram apertados diversas vezes, quando comparados ao grupo controle, onde os parafusos foram apertados uma única vez (NASCIMENTO et al. 2009). De modo semelhante, a infiltração de microrganismos pela interface implante-conector protético foi mais intensa no trabalho de Piatelli et al. (2001) que, no entanto, submeteram os conjuntos à agitação constante de 60 ciclos por minuto. Todos estes resultados descritos corroboram com os achados de Binon et al. (1996), onde os autores sugeriram que o grau de penetração através em um sistema de implantes específico é uma condição multi-fatorial, dependente da precisão de

adaptação dos componentes, o grau de micro-movimentos entre os componentes e a força final de torque usada para conectá-los.

A maior quantidade de microrganismos provenientes do interior dos implantes nos grupos submetidos à simulação de fadiga em nosso estudo pode estar relacionada a uma desadaptação dos componentes protéticos produzida pela aplicação da carga cíclica, o que sabidamente interfere na estabilidade dos componentes (BINON; MCHUGH, 1996; CARR et al., 1996; TAVAREZ, 2003). As forças oclusais cêntricas e excêntricas sobre as restaurações protéticas durante a função podem gerar flexões ou micro-movimentos dentro do sistema de implantes, aumentando as fendas e espaços entre os implantes e conectores, induzindo um efeito de bombeamento (*pump effect*) dos microrganismos e fluidos do meio externo para o interior dos implantes (BESIMO et al. 1996; STEINEBRUNNER et al. 2005). Estes espaços podem estar ainda aumentados em condições de rotações dos conectores protéticos e fratura dos parafusos de fixação (KANO et al. 2007).

Entretanto, são poucos os estudos microbiológicos *in vitro* demonstrando a infiltração de microrganismos através da interface implante-conector após ciclagem de carga. Nossos resultados foram semelhantes aos descritos por Steinebrunner et al. (2005). Este é o único estudo *in vitro*, descrito na literatura pesquisada, avaliando a passagem bacteriana através da interface implante-conector protético após simulação de carga cíclica. No estudo, foi observada a passagem da bactéria *E. coli* através da interface entre implantes e conectores protéticos de hexágono externo e interno de 5 sistemas diferentes após a aplicação de uma carga de 120 Ncm sobre os conjuntos. Grande parte dos

implantes mostrou sinais de infiltração bacteriana logo nos primeiros ciclos de carga. A média de ciclos de carga aos quais os conjuntos implantes-conectores foram submetidos até a detecção da passagem do microrganismo pela interface foi de 172.800 para o sistema Branemark e 43.000 para o sistema Frialit-2/Hermetics System, ambos com conectores do tipo hexágono externo. Nos grupos com conexão do tipo hexágono interno, a média de ciclos até a contaminação foi de 64.800 para o sistema Replace-Select system, 345.600 para o Camlog system e 24.300 para o sistema Screw-Vent System. Baseados nos resultados obtidos por estes autores, avaliamos a presença de contaminação bacteriana após a simulação de 500.000 ciclos de carga, que representa aproximadamente 1 ano e meio de mastigação (CRAIG 1993).

Da mesma forma que o observado em nosso estudo, Pautke et al. (2009) encontraram maiores quantidades do microrganismo avaliado, *E. coli*, nos implantes submetidos à carga quando comparados aos mesmos implantes em condição estática. Porém, diferentemente do que propusemos em nosso estudo, os autores avaliaram somente implantes com a plataforma protética em hexágono externo.

A geometria diferente das plataformas protéticas dos diversos sistemas existentes parece ter uma relação direta com o grau de infiltração bacteriana. Os implantes e componentes protéticos do grupo cone morse do presente estudo apresentaram os menores valores de contagem bacteriana tanto para o grupo controle como para o grupo sob aplicação de carga, sem diferenças significantes entre eles. Resultados semelhantes foram publicados por Jansen et al. (1997), Muftu et al. (1996) e Aloise et al. (2010), que demonstraram a presença de

contaminação bacteriana em implantes com conexão do tipo cone morse em níveis muito reduzidos. Dibart et al. (2005) testaram a passagem de bactérias do interior do implante para o meio externo, e no sentido inverso, de um sistema de implantes com conexão do tipo cone morse. Após o período experimental, nenhum dos implantes avaliados apresentou sinais de contaminação bacteriana nas duas condições propostas.

Esta reduzida quantidade de microrganismos encontrada nos sistemas com conexão do tipo cone morse, tanto no presente estudo quanto nos demais descritos na literatura, pode ser atribuída ao desenho da interface entre os componentes. Os implantes que utilizam conectores de travamento friccional parecem apresentar uma adaptação íntima nas porções internas mais profundas do sistema, diminuindo com isso os micro-movimentos provocados pelo desajuste dos componentes após a simulação de carga. Outro fator que pode estar relacionado aos resultados obtidos no presente estudo é o volume dos espaços internos dos 3 diferentes desenhos de implantes avaliados. Os diferentes volumes podem ter influenciado a sobrevivência e desenvolvimento bacteriano no interior dos implantes. Possivelmente, o tamanho do volume interno está associado à quantidade de nutrientes que podem se acumular no interior do implante, influenciando, assim, o crescimento e proliferação bacteriana. Com os dados obtidos após o teste de contaminação nos grupos submetidos à ciclagem de carga, foi possível verificar uma relação entre o volume interno dos implantes e a contagem bacteriana observada. Após a adaptação dos conectores protéticos, os implantes de hexágono interno apresentaram o maior volume interno ($10,33 \text{ mm}^3$), seguidos dos implantes de hexágono externo ($4,52 \text{ mm}^3$) e cone morse ($3,59$

mm³) (Apêndice A). Outro fator diretamente relacionado à geometria dos implantes e que pode ter contribuído para os reduzidos valores de contaminação observados com os implantes de cone morse foi o número de ciclos de carga proposto. Novos estudos devem ser conduzidos para investigar o efeito de um maior número de ciclos de carga sobre a infiltração bacteriana nestes componentes.

Um grande diferencial do presente estudo, em relação aos demais descritos na literatura investigando a infiltração através da interface implante-conector, foi o uso da saliva humana como fonte de contaminação dos implantes, que teve por objetivo simular a condição do meio bucal e incidência de espécies bacterianas comumente presentes na microbiota oral saudável. A diversidade de tamanho e forma das diferentes espécies, a anfibiose, os nutrientes e fatores imunológicos presentes na saliva humana podem interferir no resultado final da passagem destes microrganismos através da interface implante-conector. Os testes microbiológicos mostraram que a incidência das espécies avaliadas na saliva usada para imergir os implantes no início do estudo foi igual à incidência encontrada ao final do período de 7 dias de incubação dos espécimes. No entanto, a contagem de microrganismos foi maior na saliva inicial quando comparada à saliva ao final do experimento. Uma possível explicação para estes reduzidos números pode ser o pequeno volume de saliva utilizado para incubar os implantes, resultando em uma quantidade reduzida de nutrientes e a rápida saturação do meio de contaminação durante o período experimental, originando a morte de alguns microrganismos. Adicionalmente, as enzimas e produtos resultantes da lise celular podem ter causado a degradação do DNA de algumas espécies. Apesar da diferença na contagem de microrganismos, testes preliminares por cultura

microbiológica convencional comprovaram a viabilidade das espécies bacterianas na saliva após os 7 dias de incubação em condições de microaerofilia. O período total de imersão em saliva, tanto nos grupos controle quanto nos grupos submetidos a simulação de carga foi de 7 dias.

Os estudos encontrados na literatura, avaliando a passagem de bactérias através desta interface, restringem-se aos métodos de cultura microbiana convencional. Porém, as limitações dos métodos convencionais de identificação utilizados limitam o número de espécies que podem ser avaliadas nestes estudos. A maioria destes estudos, em seus modelos experimentais, somente avaliou a passagem de uma única espécie bacteriana através da interface implante-conector protético, espécies estas muitas vezes não freqüentes na microbiota oral e não relacionadas às infecções periodontais e peri-implantares. No entanto, as espécies relacionadas a estas infecções são, na sua grande maioria, espécies anaeróbias estritas e/ou fastidiosas e, portanto, não detectadas por métodos convencionais.

O uso da técnica de hibridização DNA Checkerboard permitiu em nosso estudo a avaliação simultânea de até 32 espécies bacterianas presentes na saliva humana, incluindo espécies responsáveis pelo início da formação do biofilme bacteriano e aquelas relacionadas às doenças periodontais e peri-implantares. Os métodos de análise de cultura microbiana convencional vêm sendo utilizados há décadas para o estudo da microbiota oral humana, apesar de limitarem-se apenas à identificação de microrganismos viáveis e cultiváveis. As técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de microrganismos têm colaborado para a melhor compreensão da microbiota envolvida nas doenças periodontais e peri-

implantares (SAKAMOTO et al., 2005; QUIRYNEN et al., 2005; DAHLÉN & LEONHARDT, 2006). Essas técnicas são mais rápidas que as convencionais e são realizadas por meio do uso de sondas de DNA. Além da avaliação simultânea de várias espécies de microrganismos em um grande número de amostras, a técnica do DNA Checkerboard tem-se mostrado mais eficiente na detecção de bactérias abrigando o interior dos implantes. Além de que, de acordo com Loesche et al. (1992), a técnica de cultura não é indicada para ser usada isoladamente em estudos de prevalência. De acordo com os autores, as técnicas de hibridação, como o DNA-Checkerboard, são significativamente superiores ao método convencional de cultura na detecção de espécies bacterianas. Este tipo de técnica, por identificar os microrganismos pelo DNA, detecta tanto espécies viáveis como não viáveis. Barbosa et al. (2009) compararam em um estudo *in vitro*, por meio de cultura microbiana convencional e DNA Checkerboard, a detecção e quantificação do microrganismo *F. nucleatum* presente no interior de implantes com conexão do tipo hexágono externo após incubação em meio de cultura. Ambos os métodos indicaram reduzidas quantidades de microrganismos abrigadas no interior dos implantes. Porém, ao final dos 14 dias de incubação, a contagem de microrganismos foi significativamente maior no grupo avaliado pelo método de hibridização DNA Checkerboard. Os autores concluíram que o método molecular de detecção é mais sensível do que a cultura convencional, permitindo a identificação de espécies viáveis e não viáveis. A detecção de microrganismos não viáveis no interior dos implantes e seus componentes constituem um fator de relevante importância, uma vez que a própria estrutura celular do microrganismo e

seus produtos de degradação podem representar um fator de risco para os tecidos de suporte, servindo como nutrientes para outras espécies oportunistas.

A não detecção de microrganismos em algumas amostras pela técnica do DNA-Checkerboard pode ser explicada pelo fato de que esta técnica de hibridação permite a detecção das espécies bacterianas somente na concentração mínima de 10^4 células. Desta forma, a ausência de sinal em algumas amostras dos grupos não submetidos à simulação de carga, não significa, necessariamente, que não havia a presença do microrganismo no interior dos implantes. Possivelmente, a quantidade de microrganismo se encontrava abaixo do nível mínimo de detecção. Essa pode ser também uma possível explicação para a diferença na incidência e quantidade de bactérias observadas nos tipos de conexões investigadas. Uma alternativa para suprir esta limitação do método, seria a utilização de técnicas complementares de detecção molecular mais sensíveis e específicas, como o Real-time PCR, no qual *primers* específicos são usados para a detecção e quantificação de cada espécie individualmente. Outro fator relacionado ao método e que pode ter interferido na detecção dos microrganismos das amostras é a ocorrência de degradação celular. A degradação celular de algumas espécies pode comprometer a integridade do material genético das mesmas, resultando em uma redução na taxa de identificação. Este é um fator que deve ser melhor estudado em estudos futuros, pois a degradação celular de alguns microrganismos pode interferir no crescimento e multiplicação dos demais.

Contudo, apesar das diversas vantagens descritas sobre as técnicas moleculares de detecção, uma dificuldade inerente ao DNA Checkerboard diz respeito à construção das sondas de DNA. A técnica requer a extração e

purificação de DNA genômico de alta qualidade. Porém, diversos microrganismos diretamente associados às doenças periodontais e peri-implantares são anaeróbios estritos e/ou fastidiosos e, portanto, de difícil obtenção e cultivo. Além disso, dificuldades técnicas adicionais durante o processo de lise celular e remoção de contaminantes são freqüentes para algumas dessas espécies. A utilização da técnica de amplificação de DNA *Multiple Displacement Amplification* (MDA) neste estudo teve por objetivo minimizar significativamente esses problemas, restringindo o procedimento de extração de DNA dos microrganismos para uma única vez, representando um recurso valioso na obtenção e manutenção de bancos de DNA genômico. A técnica permitiu a obtenção de quantidades satisfatórias de material genético para a construção das sondas e dos controles a partir de quantidades mínimas. O sequenciamento do gene 16S DNA ribossômico (rDNA), presente no genoma bacteriano, foi utilizado neste estudo para confirmar o DNA genômico extraído de todas as espécies bacterianas selecionadas como alvos de detecção da contaminação dos implantes.

A confecção das coroas protéticas nas dimensões e formato propostos neste estudo foi realizada com o intuito de criar forças de ação lateral no sistema durante o teste de ciclagem de carga, simulando desta forma as condições de forças excêntricas as quais os dentes são submetidos durante a mastigação (KHRAISAT et al., 2006). A carga de 120 N aplicada sobre os componentes está dentro dos limites clínicos fisiológicos aos quais são submetidas às próteses sobre implantes (RICHTER, 1995), e a freqüência de 1,8 Hz (aproximadamente 101 ciclos por minuto) utilizada em nosso estudo também foi similar à freqüência de mastigação humana, de 75 ciclos por minuto (MOHL et al., 1988). Ao final do teste

de simulação de carga, os conjuntos implantes-conectores foram submetidos a 500.000 ciclos, com o intuito de simular aproximadamente 1 ano e meio de mastigação (CRAIG, 1993). Os implantes submetidos à aplicação de carga cíclica foram embutidos em resina acrílica autopolimerizável para simular a absorção e distribuição de forças assim como ocorre no tecido ósseo. A resina acrílica foi o material escolhido porque o seu módulo de elasticidade é o que mais se aproxima ao do tecido ósseo. O módulo de elasticidade do osso é de 1.500 Mpa, enquanto que o dos polímeros acrílicos variam de 7 MPa a 4.000 Mpa. O uso de uma matriz metálica foi descartado, uma vez que o módulo de elasticidade do aço é 45.000 MPa (AZEVEDO et al. 2009).

Além da imersão dos conjuntos na saliva humana somente até o limite da interface entre o implante e o conector protético, a possibilidade de penetração bacteriana através do orifício de acesso superior para fixação das coroas foi eliminada pelo vedamento realizado com uma camada de guta-percha e adesivo à base de cianoacrilato. Desta forma, as células microbianas foram impedidas de passarem por outros espaços além dos existentes entre a interface implante-conector. Esses métodos foram validados em estudos anteriores (NASCIMENTO et al. 2008, BARBOSA et al. 2009). O período de tempo empregado para a observação da ocorrência de infiltração bacteriana nos grupos avaliados, 7 dias, se baseou nos resultados de outros trabalhos. Nakazato et al. (1989) verificaram que após 4 horas de exposição aos fluidos bucais há a formação de colonização bacteriana na superfície dos conectores protéticos associados aos implantes. Nascimento et al. (2008) observaram sinais de infiltração bacteriana através da interface implante-conector após 48 horas de incubação em implantes com

conectores protéticos totalmente calcináveis e após 72 horas em implantes com conectores calcináveis com a plataforma protética pré-fabricada em Co-Cr. Em um outro estudo semelhante, porém, desta vez avaliando a passagem de microrganismos do meio externo para o interior dos implantes, os mesmos autores observaram a presença de quantidades significantes de bactérias abrigadas no interior de implantes de hexágono externo após 7 dias de incubação (NASCIMENTO et al. 2009). Em ambos os estudos, os conjuntos implantes-conectores não foram submetidos à simulação de carga cíclica.

Diversas investigações descritas neste estudo, e ao longo dos anos na literatura, comprovam que a falta de uma perfeita adaptação entre os implantes de 2 partes e seus componentes protéticos favorecem a instalação e desenvolvimento do biofilme bacteriano, e sugerem que novos estudos são necessários para determinar a composição desse biofilme em várias etapas clínicas para compreender seu papel na manutenção da saúde periodontal ou no possível desenvolvimento de doenças. Apesar dos relatos na literatura mostrarem que os sistemas de conexão do tipo cone morse apresentam uma maior precisão de adaptação marginal e estabilidade entre os seus componentes e, conseqüentemente, uma menor probabilidade de infiltração bacteriana, tanto os resultados obtidos no presente estudo quanto os relatados por investigações microbiológicas semelhantes, apresentaram sinais da passagem de microrganismos através da interface implante-conector deste sistema de conexão.

Os dados do presente estudo, no modelo experimental proposto, trazem informações adicionais e complementam aquelas já descritas por investigações semelhantes, onde os espaços e fendas provenientes de uma imperfeita

adaptação entre os implantes e seus componentes possibilitam a passagem e colonização bacteriana, e que esta contaminação é mais significativa quando os implantes são submetidos a cargas cíclicas constantes. As informações obtidas podem auxiliar no entendimento de algumas dúvidas pertinentes ao assunto, atentando para a necessidade de novas investigações que busquem o desenvolvimento de uma adaptação mais precisa entre os implantes e seus componentes ou novas alternativas para se evitar ou minimizar a infiltração bacteriana, além de estudos clínicos controlados correlacionando o biofilme bacteriano presente nos sulcos periodontais, peri-implantares e interior dos implantes e seus componentes.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- 1) A passagem de microrganismos presentes na saliva humana, *in vitro*, através da interface implante-conector protético ocorreu nos implantes dos 3 tipos de conexões avaliadas, hexágono externo, hexágono interno e cone morse, tanto nos grupos avaliados de forma estática (controle) quanto nos grupos submetidos à simulação de carga cíclica controlada.

- 2) Nos grupos controles, os implantes de hexágono interno apresentaram maiores contagens de bactérias do que os implantes de hexágono externo e cone morse. Todos os tipos de conexões mostraram diferenças significantes em relação à incidência de espécies bacterianas abrigadas no interior dos implantes.

- 3) Dentre os grupos submetidos à simulação de carga cíclica, os implantes de cone morse apresentaram menores contagens de bactérias e menor incidência de espécies do que os implantes de hexágono externo e interno.

- 4) A ciclagem de carga aumentou significativamente a incidência de espécies e contagem bacteriana nos implantes com conexão do tipo hexagonal externa e interna.

8. REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação:
referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABERG, C.H.; SJÖDIN, B.; LAKIO, L.; PUSSINEN, P.J.; JOHANSSON, A.; CLAEISSON, R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 36, n. 10, p. 815-822, Oct. 2009.

ADELL, R.; LEKHOLM, U.; ROCKLER, B.; BRÅNEMARK, P.I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **International Journal of Oral Surgery**, Copenhagen, v. 10, n. 6, p. 387-416, Dec. 1981.

AKÇA, K.; CEHRELI, M.C. A photoelastic and strain-gauge analysis of interface force transmission of internal-cone implants. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 28, n. 4, p. 391-399, Aug. 2008.

ALBREKTSSON, T.; SENNERBY, L. Direct bone anchorage of oral implants: clinical and experimental considerations of the concept of osseointegration. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 3, n. 1, p. 30-41, Jan-Feb. 1990.

ALBREKTSSON, T.; ISIDOR, F. Consensus report of session IV. In: LANG, N.P.; KARRING, T. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology 1993. **Quintessence Publishing Company**, p. 365-369, 1994.

ALOISE, J.P.; CURCIO, R.; LAPORTA, M.Z.; ROSSI, L.; DA SILVA, A.M.; RAPOPORT, A. Microbial leakage through the implant-abutment interface of Morse taper implants in vitro. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, 2010. In Press.

ARANK, A.; SYED, S.A.; KENNEY, E.B.; FRETER, R. Isolation of anaerobic bacteria from human gingiva and mouse cecum by means of a simplified glove box procedure. **Applied Microbiology**, Washington, v. 17, n. 4, p. 568-576, Apr. 1969.

AZEVEDO, E.C.; NETO, S.C.; CHIERICE, G.O.; LEPIENSKI, C.M. Aplicação de indentação instrumentada na caracterização mecânica de poliuretano derivada de óleo de mamona. **Polímeros**, v. 19, n. 4, 2009.

BALFOUR, A.; O'BRIEN, G.R. Comparative study of antirotational single tooth abutments. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St.Louis, v. 73, n. 1, p. 36-43, Jan. 1995.

BARBOSA, R.E.S.; DO NASCIMENTO, C.; ISSA, J.P.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; DE ALBUQUERQUE JR, R.F. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 376-381, Jul. 2009.

BESIMO, D.; BODENSCHATZ, V.; GUGGENHEIM, R.; HASSELL, T. Marginal fit of prefabricated crowns of the Ha-Ti implant system: an in vitro scanning electron microscopic study. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 9, n. 1, p. 87-94, Jan-Feb. 1996.

BINON, P.; McHUGH, M. The effect of eliminating implant/abutment rotational misfit on screw joint stability. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 9, n. 6, p. 511-519, Nov-Dec. 1996.

BINON PP. Implants and components: entering the new millennium. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 1, p. 76-94, Jan-Feb. 2000.

BLOCK, M.S.; MERCANTE, D.E.; LIRETTE, D.; MOHAMED, W.; RYSER, M.; CASTELLON, P. Prospective evaluation of immediate and delayed provisional single tooth restorations. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, n. 67, v. 11, p. 89-107, Nov. 2009.

BORGES, M.A.; DE FIGUEIREDO, L.C.; DE BRITO JR, R.B.; FAVERI, M.; FERES, M. Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, n. 23, v. 2, p. 203-208, Apr-Jun. 2009.

BORNSTEIN, M.M.; SCHMID, B.; BELSER, U.C.; LUSSI, A.; BUSER, D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. **Clinical Oral Implants Research**, Compenhagen, n. 16, v. 6, p. 631-638, Dec. 2005.

BOTERO, J.E.; GONZÁLEZ, A.M.; MERCADO, R.A.; OLAVE, G.; CONTRERAS, A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 17, n. 9, p. 1490-1495, Sep. 2005.

BOWDEN, G.; EDWARDSSON, S. Ecologia oral e a cárie dentária. In:____. **Cariologia Clínica**. Ed Santos, 1995. p.45-62.

BRÄGGER, U.; KAROUSSIS, I.; PERSSON, R.; PJETURSSON, B.; SALVI, G.; LANG, N. Technical and biological complications/failures with single crowns and fixed partial dentures on implants: a 10-year prospective cohort study. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 326-334, Jun. 2005.

BRÄNEMARK, P.I.; BRANEMARK, P.I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B.O.; LINDSTROM, J.; OHLSSON, A. Intra-osseous anchorage of dental protheses. I. Experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, Stockholm, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BRÄNEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. Tissue-integrated protheses. London, **Quintessence**, 1985.

BRUNSK, J.B.; PUELO, D.A.; NANCI, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. **Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 1, p. 15-46, Jan-Feb. 2000.

BUSER, D.; MERICSKE-STERN, R.; BERNARD, J.P.; BEHNEKE, A.; BEHNEKE, N.; HIRT, H.P.; BELSER, U.C.; LANG, N.P. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 8, n. 3, p. 161-172, Jun. 1997.

BYRNE, D.; HOUSTON, F.; CLEARY, R.; CLAFFEY, N. The fit of cast and premachined implant abutments. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, n. 80, v. 2, p. 184-192, Aug. 1998.

BYRNE, D.; JACOBS, S.; O'CONNELL, B.; HOUSTON, F.; CLAFFEY, N. Preloads generated with repeated tightening in three types of screws used in dental implant assemblies. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, n. 15, v. 3, p. 164-171, May-Jun. 2006.

CALLAN, D.P.; COBB, C.M.; WILLIAMS, K.B. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. **Journal of Periodontology**, Chicago, n. 76, v. 1, p. 115-120, Jan. 2005.

CAO, C.F.; AEPPLI, D.M.; LILJEMARK, W.F.; BLOOMQUIST, C.G.; BANDT, C.L.; WOLF, L.F. Comparison of plaque microflora between Chinese and Caucasian population groups. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 115-118, Feb. 1990.

CARR, A.; BRUNSKI, J.; HURLEY, E. Effects of fabrication, finishing, and polishing procedures on preload in prostheses using conventional "gold" and plastic cylinders. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 11, n. 5, p. 589-598, Sep-Oct. 1996.

COSTA, C.E.; CORREA, M.E.; MARQUES JR, J.F. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, n. 21, n. 5, p. 535-542, may. 2010.

COSYN, J.; VAN AELST, L.; COLLAERT, B.; PERSSON, G.R.; DE BRUYN, H. The Peri-Implant Sulcus Compared with Internal Implant and Suprastructure Components: A Microbiological Analysis. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, 2009. In Press.

COVANI, U.; MARCONCINI, S.; CRESPI, R.; BARONE, A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 298-304, Sep. 2006.

COX, J.F.; ZARB, G.A. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants. v. 2, p. 91-100, 1987.

Craig RG. Restorative dental materials. 9th ed. St Louis: Mosby; 1993. p. 75-77.

CRESPI, R.; CAPPARÈ, P.; GHERLONE, E.; ROMANOS, G.E. Immediate occlusal loading of implants placed in fresh sockets after tooth extraction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 22, n. 6, p. 955-962, Nov-Dec. 2007.

CUGINI, M.A.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; KENT Jr, R.L.; SOCRANSKY, S.S. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 27, n. 1, p. 30-36, Jan. 2000.

DAHLÈN, G.; LEONHARDT A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 6-11, Feb. 2006.

DELLOW, A.G.; DRIESSEN, C.H.; HANNES, J.C. Scanning electron microscopy evaluation of the interfacial fit of interchanged components of four dental implant systems. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 10, n. 3, p. 216-221, May-Jun. 1997.

DEMMER, R.T.; PAPAPANOU, P.N.; JACOBS JR, D.R.; DESVARIEUX, M. Evaluating clinical periodontal measures as surrogates for bacterial exposure: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. **BMC Medical Research Methodology**, London, v. 7, p. 10-12, Jan. 2010.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D.A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, London, v. 449, n. 7164, p. 811-818, Oct. 2007.

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

DUARTE, A.R.; ROSSETTI, P.H.; ROSSETTI, L.M.; TORRES, S.A.; BONACHELA, W.C. In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 77, n. 11, p. 1828-1832, Nov. 2006.

ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, Jun. 2005.

ELLEN, R. P. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. **International Journal of Prosthodontics**, Lombard, v. 11, n. 5, p. 433-441, Sep-Oct. 1998.

ERICSSON, I.; PERSSON, L. G.; BERGLUNDH, T.; MARINELLO, C. P.; LINDHE, J.; KLINGE, B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 22, n. 3, p. 255-261, Mar. 1995.

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

GRICE, C.A.; TAYS, K.L.; SAVALL, B.M.; WEI, J.; BUTLER, C.R.; AXE, F.U.; BEMBENEK, S.D.; FOURIE, A.M.; DUNFORD, P.J.; LUNDEEN, K.; COLES, F.; XUE, X.; RILEY, J.P.; WILLIAMS, K.N.; KARLSSON, L.; EDWARDS, J.P. Identification of a potent, selective, and orally active leukotriene a4 hydrolase inhibitor with anti-inflammatory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, n. 14, p. 4150-4169, Jul. 2008.

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

GU, F.; LI, Y.; ZHOU, C.; WONG, D.T.; HO, C.M.; QI, F.; SHI, W. Bacterial 16S rRNA/rDNA Profiling in the Liquid Phase of Human Saliva. **Open Dentistry Journal**, Bentham, v. 3, p. 80-84, Apr. 2009.

HAFFAJEE, A.D.; ROBERTS, C.; MURRAY, L.; VEIGA, N.; MARTIN, L.; TELES, R.P.; LETTERI, M.; SOCRANSKY, S.S. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. **Journal of Clinical Dentistry**, Yardley, v. 20 n. 7, p. 211-217, 2009

HAGIWARA, Y.; SUZUKI, Y.; IGARASHI, T. Three dimensional compatibility of implant components by using scanning laser microscope. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 76, p. 427, 1997.

HENRY, P.; ROSENBERG, I. Single-stage surgery for rehabilitation of the edentulous mandible: preliminary results. **Practical Periodontics & Aesthetic Dentistry**, New York, v. 6, n. 9, p. 15-22, Nov-Dec. 1994.

HILL, D.A.; HOFFMANN, C.; ABT, M.C.; DU, Y.; KOBULEY, D.; KIRN, T.J.; BUSHMAN, F.D.; ARTIS, D. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. **Mucosal Immunology**, New York, v. 3, n. 2, p. 148-158, Mar. 2010.

HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S.; SHIVES, M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. **Archives in Oral Biology**, Oxford, v. 30, n. 11-12, p. 791-795, 1985.

ISTVÁN, V.; KATALIN, N. Long term (10 years) experience of immediate implant placement. **Fogorvosi Szemle**, Budapest, v. 102, n. 6, p. 217-222, Dec. 2009.

JANSEN, V.K.; CONRADS, G.; RICHTER, E.J. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 12, n. 4, p. 527-540, Jul-Aug. 1997.

KANO, SC; BINON, P; BONFANTE, G; CURTIS, DA. Effect of casting procedures on screw loosening in UCLA-type abutments. **Journal of Prosthodontics**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 77-81, Mar-Apr. 2006.

KANO, S.C.; BINON, P.P.; CURTIS, D.A. A classification system to measure the implant-abutment microgap. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 22, n. 6, p. 879-885, Nov-Dec. 2007.

KHRAISAT, A.; BAQAIN, Z.H.; SMADI, L.; NOMURA, S.; MIYAKAWA, O.; ELNASSER, Z. Abutment rotational displacement of external hexagon implant system under lateral cyclic loading. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 96-99, 2006.

KIM, K.; HEIMISDOTTIR, K.; GEBAUER, U.; PERSSON, G.R. Clinical and microbiological findings at sites treated with orthodontic fixed appliances in adolescents. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, St. Louis, v. 137, n. 2, p. 223-228, Feb. 2010.

KRENNMAIR, G.; SCHMIDINGER, S.; WALDENBERGER, O. Single-tooth replacement with the Frialit-2 system: a retrospective clinical analysis of 146 implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 17, n. 1, p. 78-85, Jan-Feb. 2002.

LEKHOLM, U.; ADELL, R.; BRANEMARK, P.I. Complications. In: BRANEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. Tissue-Integrated prostheses. Osseointegration in clinical dentistry. **Quintessence Co**, Inc. Chicago, Illinois, 1985. Cap.14.

LEONHARDT, A.; RENVERT, S.; DAHLÉN, G. Microbial findings at failing implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 10, n. 5, p. 339-345, Oct. 1999.

LEONHARDT, A.; DAHLÉN, G.; RENVERT, S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 74, n. 10, p. 1415-1422, Oct. 2003.

LI, X.X.; WONG, G.L.; TO, K.F.; WONG, V.W.; LAI, L.H.; CHOW, D.K.; LAU, J.Y.; SUNG, J.J.; DING, C. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. **PLoS One**, San Francisco, 4:e7985, Nov. 2009.

LINDHE, J.; BERGLUNDH, T.; ERICSSON, I.; LILJENBERG, B.; MARINELLO, C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 9-16, Mar. 1992.

LOESCHE, W.J.; LOPATIN, D.E.; STOLL, J.; VAN POPERIN, N.; HUJOEL, P.P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 2, p. 418-426, Feb. 1992.

MACFARLANE, S.; FURRIE, E.; MACFARLANE, G.T.; DILLON, J.F. Microbial colonization of the upper gastrointestinal tract in patients with Barrett's esophagus. **Clinical Infections Diseases**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 29-38, Jul. 2007.

MAGINI, R.S.; SCHIOCHETT C. Históricos dos implantes: do sonho à realidade. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 56, n. 5, p. 245-251, 1999.

MÄKIVUOKKO, H.; TIIHONEN, K.; TYNKKYNNEN, S.; PAULIN, L.; RAUTONEN, N. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 103, n. 2, p. 227-234, Jan. 2010.

MERZ, B.R.; HUNENBART, S.; BELSER, U.C. Mechanics of the implant-abutment connection: an 8-degree taper compared to a butt joint connection. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 15, n. 4, p. 519-526, Jul-Aug. 2000.

MISCH, C.E.; MISCH-DIETSH, F.; SILC, J.; BARBOZA, E.; CIANCIOLA, L.J.; KAZOR, C. Posterior implant single-tooth replacement and status of adjacent teeth during a 10-year period: a retrospective report. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 79, n. 12, p. 2378-2382, Dec. 2008.

MOHL, N.D.; ZARB, G.A.; CARLSSON, G.E.; RUGH, J.D. A textbook of occlusion. Chicago: **Quintessence**; 1988. p.143-52.

MOMBELLI, A; Van OOSTEN, M.A.C.; SCHURCH, E.; LANG, N.P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 2, n. 4, p. 145-151, May. 1987.

MOMBELLI, A.; BUSER, D.; LANG, N.P. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 3, n. 3, p. 113-120, Sep. 1988.

MOMBELLI, A.; MERICSKE-STERN, R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 1, n. 1, p. 1-7, Dec. 1990.

MOMBELLI, A.; BURGIN, W.; BUSER, D.; LANG, N.P.; RUTAR, A. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 189-195, Jun. 2001.

MULLARD A. Microbiology: the inside story. **Nature**, London, v. 453, n. 7195, p. 578-580, Aug. 2008.

MUFTU, A.; CHAPMAN, R.J.; MULCAHY, H.L. Comparison of Microbial Penetration Between Components of Screw and Locking Taper Implant-Abutment Connections. **IADR**, San Francisco, 1996. Disponível em: <<http://biconresearch.wordpress.com/1996/03/01/comparison-of-microbial-penetration-between-components-of-screw-and-locking-taper-implantabutment-connections/4>>. Acesso em Jul. 2010.

NASCIMENTO, C.; BARBOSA, R.E.S.; ISSA, J.P.M.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; MONESI, N.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.F. The use of fluorescein for labeling genomic probes in the checkerboard DNA-DNA hybridization method. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 4, p. 403-407, 2008.

NASCIMENTO, C.; BARBOSA, R.E.; ISSA, J.P.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.F. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 177-180, Feb. 2008.

NASCIMENTO, C.; BARBOSA, R.E.; ISSA, J.P.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R.F. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments International. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 20, n. 6, p. 571-577, Jun. 2009.

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

NENTWIG GH. Ankylos implant system: concept and clinical application. **Journal of Oral Implantology**, Abington, v. 30, n. 3, p. 171-177, 2004.

OAKLEY, B.B.; FIEDLER, T.L.; MARRAZZO, J.M.; FREDRICKS, D.N. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p. 4898-4909, Aug. 2008.

ONG, G.; SOH, G.; CHONG, Y.H. Periodontal status of institutionalized elderly in Singapore. **Community Dentistry in Oral Epidemiology**, Copenhagen, v. 20, n. 6, p. 382-383, Dec. 1992.

PALMER, R.M.; PALMER, P.J.; SMITH, B.J. A 5-year prospective study of Astra single tooth implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 11, n. 2, p. 179-182, Apr. 2000.

PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., ERICSON, R. E., LAU, C. N., LEVANOS, V. A., SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, n. 12, p. 3770–3783, Jun. 2001.

PAUTKE, C.; KOLK, A.; BROKATE, M.; WEHRSTEDT, J.C.; KNEISSL, F.; MIETHKE, T.; STEINHAUSER, E.; HORCH, H.H.; DEPPE, H. Development of novel implant abutments using the shape memory alloy nitinol: preliminary results. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 24, n. 3, p. 477-483, May-Jun. 2003.

PERSSON, L.G.; LEKHOLM, U., LEONHARDT, A.; DAHLEN, G.; LINDHE J. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 90-95, Jun. 1996.

PIATTELLI, A.; SCARANO, A.; PAOLANTONIO, M.; ASSENZA, B.; LEGHISSA, G.C.; DI BONAVENTURA, G.; CATAMO, G.; PICCOLOMINI R. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 72, n. 9, p. 1146-1150, Sep. 2001.

PITT, T.L.; SAUNDERS, N.A. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 53, n. 1, p. 71-75, Jan. 2000.

PROFF, P.; STEINMETZ, I.; BAYERLEIN, T.; DIETZE, S.; FANGHÄNEL, J.; GEDRANGE, T. Bacterial colonisation of interior implant threads with and without sealing. **Folia Morphologica**, Warszawa, v. 65, n. 1, p. 75-77, Feb. 2006.

QUARESMA, S.E.; CURY, P.R.; SENDYK, W.R.; SENDYK, C. A finite element analysis of two different dental implants: stress distribution in the prosthesis, abutment, implant, and supporting bone. **Journal of Oral Implantology**, Abington, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2008.

QUIRYNEN, M.; Van STEENBERGHE, D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 4, n. 3, p. 158-161, Sep. 1993.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C.M.; EYSSEN, H.; Van STEENBERGHE, D. Microbial penetration along the implant components of the Branemark System. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 239-244, Dec. 1994.

QUIRYNEN, M.; De SOETE, M.; Van STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.13, n. 1, p.1-19, Feb. 2002.

QUIRYNEN, M.; ALSAAD, G.; PAUWELS, M.; HAFFAJEE, A.; Van STEENBERGHE, D.; NAERT, I. Microbiological and clinical outcomes and patient satisfaction for two treatment options in the edentulous lower jaw after 10 years of function. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 277-287, Jun. 2005.

QUIRYNEN, M.; VOGELS, R.; PEETERS, W., van STEENBERGHE, D.; NAERT, I.; HAFFAJEE, A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 17, n. 1, p. 25-37, Feb. 2006.

RANDOW, K.; ERICSSON, I.; NILNER, K.; PETERSSON, A.; GLANTZ, P.O. Immediate functional loading of Brånemark dental implants. An 18-month clinical follow-up study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 10, n. 1, p. 8-15, Feb. 1999.

RENVERT, S.; DAHLÉN, G.; WIKSTRÖM, M. The clinical and microbiological effects of non-surgical periodontal therapy in smokers and non-smokers. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 153-157, Feb. 1998.

RICCI, G.; AIMETTI, M.; STABLUM, W.; GUASTI, A. Crestal bone resorption 5 years after implant loading: clinical and radiologic results with a 2-stage implant system. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 19, n. 4, p. 597-602, Jul-Aug. 2004.

RICHTER EJ. In vivo vertical forces on implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 10, n. 1, p. 99-108, Jan-Feb. 1995.

RIMONDINI, L.; MARIN, C.; BRUNELLE, F.; FINI, M. Internal contamination of a 2-component implant system after occlusal loading and provisionally luted reconstruction with or without a washer device. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 72, n. 12, p. 1652-1657, Dec. 2001.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR, J.F. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in primary endodontic infections. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v. 109, n. 3, p. 474-478, Mar. 2010.

ROCCUZZO, M.; AGLIETTA, M.; CORDARO, L. Implant loading protocols for partially edentulous maxillary posterior sites. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, 24 Suppl., p. 147-57, 2009.

ROLPH, H.J.; LENNON, A.; RIGGIO, M.P.; SAUNDERS, W.P.; MACKENZIE, D.; COLDERO, L.; BAGG, J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3282-3289, Sep. 2001.

ROMANOS, G.E.; TOH, C.G.; SIAR, C.H.; SWAMINATHAN, D. Histologic and histomorphometric evaluation of peri-implant bone subjected to immediate loading: an experimental study with *Macaca fascicularis*. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 17, n. 1, p. 44-51, Jan-Feb. 2002.

ROMERO, G.G.; ENGELMEIER, R.; POWERS, J.M.; CANTERBURY, A.A. Accuracy of three corrective techniques for implant bar fabrication. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 84, n. 6, p. 602-607, Dec. 2000.

SAHIN, S.; CEHRELI, M.C. The significance of passive framework fit in implant prosthodontics: current status. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 10, n. 2, p. 85-92, 2001.

SAILER, I.; SAILER, T.; STAWARCZYK, B.; JUNG, R.E.; HÄMMERLE, C.H. In vitro study of the influence of the type of connection on the fracture load of zirconia abutments with internal and external implant-abutment connections. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 24, n. 5, p. 850-858, Sep-Oct. 2009.

SAITO, A.; HOSAKA, Y.; SEKIGUCHI, K.; KIGURE, T.; ISOBE, S.; SHIBUKAWA, Y.; SUMII, H.; ITO, T.; NAKAGAWA, T.; YAMADA, S. Responses of peri-implant tissues to undisturbed plaque formation in dogs: clinical, radiographic, and microbiological findings. **Bulletin of Tokyo Dental College**, Tokyo, v. 38, n. 1, p. 13-20, Feb. 1997.

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

SARTORI, I. Análise comparativa da interface intermediário estético/cilindro protético, torneados em ouro ou em plástico, antes e após as fundições. 1999. **Dissertação Mestrado** – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SBORDONE, L.; RAMAGLIA, L.; BARONE, A.; CIAGLIA, R.N.; TENORE, A.; IACONO, V.J. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 66, n. 6, p. 452-461, Jun. 1995.

SCHNITMAN, P.A. ; WOHRLE, P.S. ; RUBENSTEIN, J.E. Immediate fixed interim prostheses supported by two-stage threaded implants: methodology and results. **Journal of Oral Implantology**, Abington, v. 16, n. 2, p. 96-105, 1990.

SCHWARZ, S.; GABBERT, O.; HASSEL, A.J.; SCHMITTER, M.; SÉCHÉ, C.; RAMMELSBERG, P. Early loading of implants with fixed dental prostheses in edentulous mandibles: 4.5-year clinical results from a prospective study. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 21, n. 3, p. 284-289, Mar. 2010.

SHIBLI, J.A.; VITUSSI, T.R.; GARCIA, R.V.; ZENÓBIO, E.G.; OTA-TSUZUKI, C.; CASSONI, A.; PIATTELLI, A.; D'AVILA, S. Implant surface analysis and microbiologic evaluation of failed implants retrieved from smokers. **Journal of Oral Implantology**, Abington, v. 33, n. 4, p. 232-238, 2007.

SHIN, Y.K.; HAN, C.H.; HEO, S.J.; KIM, S.; CHUN, H.J. Radiographic evaluation of marginal bone level around implants with different neck designs after 1 year. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 21, n. 5, p. 789-794, Sep-Oct. 2006.

SKALAK, R. Biomechanical considerations in osseointegrated prostheses. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 49, n. 6, p. 843-848, Jun. 1983.

SMITH, D.E.; ZARB, G.A. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 62, n. 5, p. 567-572, Nov. 1989.

SOCRANSKY, S.S.; MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 42, n. 8, p. 485-496, Aug. 1971.

SOCRANSKY, S.S. Association between microbial species in subgingival plaque samples. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1988.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Biotechniques**, London, v. 17, n. 4, p. 788-792, Oct. 1994.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 134-144, Jun. 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 28, p. 12-55, 2002.

SORENSEN, J.A., ÁVERA, S.P., TOMAS, C. Comparison of interface fidelity of implant systems. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 70, p. 540, 1991.

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

TAVAREZ, R.R.J. Análise comparativa das interfaces de implantes de conexão externa e interna em restaurações unitárias cimentadas e parafusadas, antes e após ensaios de fadiga. 2003. **Tese Doutorado** – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

TRAVERSY, M.C., BIREK, P. Fluid and microbial leakage of implant-abutment assembly *in vitro*. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 71, p. 754, 1992.

TELES, R.; SAKELLARI, D.; TELES, F.; KONSTANTINIDIS, A.; KENT, R.; SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 1, p. 89-98, Jan. 2010.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project. **Nature**, London, v. 449, n. 7164, p. 804-810, Oct. 2007.

VETTORE, M.V.; LEÃO, A.T.; LEAL, M.D.O.C.; FERES, M.; DE FIGUEIREDO, L.C.; SHEIHAM, A. Periodontal bacterial load: a proposed new epidemiological method for periodontal disease assessment. **Journal of Contemporary Dental Practice**, Cincinnati, v. 11, n. 1, p. In Press, Jan. 2010.

VIGOLO, P.; MAJZOUN, Z.V.; CORDIOLI, G. Measurement of the dimensions and abutment rotational freedom of gold machined 3i UCLA type abutments in the as-received condition, after casting with a noble metal alloy and porcelain firing. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 84, n. 5, p. 548-553, Nov. 2000.

WEISS, E.I.; KOZAK, D.; GROSS, M.D. Effect of repeated closures on opening torque values in seven abutment-implant systems. **Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 84, n. 2, p. 194-199, Aug. 2000.

WHELEN, A.C.; PERSING, D.H. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 349-373, 1996.

ZEE, K.Y.; SAMARAYABE, L.P.; ATTSTROM, R. Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese rapid and slow plaque formers. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 23, n. 11, p. 1025-1031, Nov. 1996.

9. APÊNDICE

9. 1 Apêndice A



Hexágono Externo: Espaço interno do implante sem o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume final de 14,87 mm³.



Hexágono Externo: Espaço interno do implante com o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume final de 4,52 mm³.



Hexágono Interno: Espaço interno do implante sem o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume final de 29,28 mm³.



Hexágono Interno: Espaço interno do implante com o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume final de 10,33 mm³.



Cone Morse: Espaço interno do implante sem o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume total de 22,62 mm³.



Cone Morse: Espaço interno do implante com o parafuso de fixação do conector protético correspondendo a um volume final de 3,59 mm³.

Figura 50 – Perfil interno dos implantes utilizados no presente estudo.

9. 5 Apêndice E

Tabela 10 – Contagem bacteriana das amostras provenientes dos implantes de conexão do tipo hexágono externo após simulação de carga cíclica.

	HE Carga 1	HE Carga 2	HE Carga 3	HE Carga 4	HE Carga 5	HE Carga 6	HE Carga 7	HE Carga 8	HE Carga 9	HE Carga 10	10x5	10x6
<i>A.a</i>	387086,84	489395,88	427894,89	474077,81	547182,58	482185,57	572996,21	545235,97	441360,73	515778,10	100000,00	1000000,00
<i>A.a</i>	0	489395,89	306031,22	333644,39	408454,32	388818,06	405188,17	381807,50	395053,33	445377,85	100000,00	1000000,00
<i>B.fragilis</i>	0	489395,90	246175,75	311337,19	278898,61	288012,68	456927,78	378914,23	425324,12	401422,92	100000,00	1000000,00
<i>C.gingivalis</i>	391839,29	489395,91	548417,59	430011,72	435294,53	465718,18	580835,32	452316,60	481617,57	388563,29	100000,00	1000000,00
<i>E.faecalis</i>	0	489395,92	172216,95	253996,33	164000,34	238275,27	157106,74	232483,51	331308,12	277786,93	100000,00	1000000,00
<i>E.corrodens</i>	0	489395,93	269339,87	259527,53	301538,74	264193,13	252727,15	292720,55	300971,32	266320,38	100000,00	1000000,00
<i>P.gingivalis</i>	0	489395,94	228780,80	279287,12	360671,62	247627,31	286332,42	249240,98	197203,78	290098,83	100000,00	1000000,00
<i>P.melaninogenica</i>	0	489395,95	256722,85	249047,02	235141,71	286154,09	275769,69	306116,33	261858,59	299658,15	100000,00	1000000,00
<i>P.itermedia</i>	0	489395,96	305437,74	284305,33	230652,71	288706,33	344723,59	290690,57	315455,05	211688,66	100000,00	1000000,00
<i>P.putida</i>	0	489395,97	299025,88	336906,49	291768,09	311089,38	262163,15	317349,55	192069,19	313527,55	100000,00	1000000,00
<i>S.aureus</i>	0	489395,98	284364,39	279010,36	270050,89	242870,23	358560,00	343435,31	311590,79	342765,99	100000,00	1000000,00
<i>S.constelatus</i>	0	489395,99	261936,76	253564,97	275114,84	317712,58	300528,96	388751,47	283011,84	370360,64	100000,00	1000000,00
<i>S.mutans</i>	323809,47	489395,10	410695,64	351380,96	386995,36	392680,58	435354,17	354618,16	495327,75	418817,88	100000,00	1000000,00
<i>S.oralis</i>	280164,89	489395,10	309538,23	302241,65	277496,85	279759,01	352900,84	280453,81	261900,28	354728,74	100000,00	1000000,00
<i>S.sanguinis</i>	346215,68	489395,10	322078,83	311561,84	313945,02	329949,78	473945,80	316683,11	317682,47	353257,50	100000,00	1000000,00
<i>S.sobrinus</i>	387796,12	489395,10	369296,43	369434,81	263601,39	279379,19	334743,92	318684,14	446937,10	301905,83	100000,00	1000000,00
<i>S.salivarius</i>	309406,22	489395,10	234499,60	256884,39	294979,81	541997,62	250614,96	290853,26	307676,74	294464,50	100000,00	1000000,00
<i>S.parasanguinis</i>	257164,62	489395,10	254676,65	243600,93	223665,89	187383,33	431013,39	330033,74	282102,23	301793,50	100000,00	1000000,00
<i>S.morei</i>	298101,21	489395,10	354430,56	414193,39	377810,07	377628,85	435192,63	385292,51	376396,15	361596,86	100000,00	1000000,00
<i>T.denticola</i>	0	489395,10	264875,77	274401,51	284017,57	395675,75	389699,30	357098,60	270184,64	299685,94	100000,00	1000000,00
<i>T.forsythensis</i>	0	489395,10	291954,53	350105,42	280230,90	317338,54	287904,99	386882,87	296215,98	316001,63	100000,00	1000000,00
<i>V.parvula</i>	0	489395,10	305415,74	345821,96	345707,32	329854,25	237797,59	179837,19	444761,21	305242,04	100000,00	1000000,00
<i>F.nucleatum</i>	0	489395,11	289819,17	260854,60	319882,10	319344,21	275738,42	268964,68	254467,63	462729,95	100000,00	1000000,00
<i>F.periodonticum</i>	0	489395,11	306811,13	380212,93	353600,85	338069,70	460407,00	282561,38	362104,07	360688,99	100000,00	1000000,00
<i>P.endodontalis</i>	0	489395,11	354750,75	416575,98	297093,75	283994,41	293985,09	531055,64	376287,30	341611,46	100000,00	1000000,00
<i>P.micros</i>	0	489395,11	320524,21	244445,11	321511,41	335024,15	561774,00	27259,46	357437,89	110603,05	100000,00	1000000,00
<i>N.mucoosa</i>	0	489395,11	335601,42	389141,72	260554,68	321867,50	262507,07	362666,28	309425,91	333916,52	100000,00	1000000,00
<i>P.aeruginosa</i>	0	489395,11	402356,28	302775,49	411158,84	410226,07	275226,01	408332,73	357905,15	524153,94	100000,00	1000000,00
<i>S.gordonii</i>	0	489395,11	290268,47	322090,41	299552,19	369800,16	387957,66	378577,25	352171,87	414555,84	100000,00	1000000,00
<i>S.mitis</i>	292478,52	489395,11	429721,64	478254,73	482655,72	474237,61	461100,64	512826,93	520474,38	530304,10	100000,00	1000000,00
<i>L.casei</i>	384852,47	489395,11	288017,89	305950,74	312856,49	359617,84	382505,20	517313,03	493077,17	400374,35	100000,00	1000000,00
<i>S.pasteuri</i>	417102,87	489395,11	310361,57	313312,17	338436,21	330640,53	231064,96	316484,52	330703,06	360107,67	100000,00	1000000,00

9. 6 Apêndice F

Tabela 11 – Contagem bacteriana das amostras provenientes dos implantes de conexão do tipo hexágono interno sem aplicação de carga cíclica (controle).

	HI Controle 1	HI Controle 2	HI Controle 3	HI Controle 4	HI Controle 5	HI Controle 6	HI Controle 7	HI Controle 8	HI Controle 9	HI Controle 10	10x5	10x6	
Aa a	943414,73	944843,06	0	0	0	796154,94	817822,26	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
Aa b	747540,39	803702,05	0	0	0	528514,59	512177,78	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
B.fragilis	851632,97	826788,97	0	0	0	0	531348,57	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
C.gingivalis	841076,60	819448,53	0	0	0	0	3676960,03	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
E.faecalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
E.corrodens	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.gingivalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.melaninogenica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.itermedia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.putida	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.aureus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.constelatus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.mutans	0	0	0	0	0	391763,21	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.oralis	0	0	0	0	0	475289,80	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.sanguinis	0	0	0	0	0	358987,56	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.sobrinus	0	0	0	0	0	304534,12	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.salivarius	0	0	0	0	0	309477,46	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.parasanguinis	0	0	0	0	0	375806,58	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.morei	0	0	0	0	0	339767,93	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
T.denticola	0	0	0	0	0	316059,27	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
T.forsytheris	0	0	0	0	0	291072,28	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
V.parvula	0	0	0	0	0	195485,13	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
F.nucleatum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
F.periodonticum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.endodontalis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.micros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
N.mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
P.aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.gordonii	268784,97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.mitis	186243,73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
L.casei	311610,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
S.pasteuri	292537,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00

9. 7 Apêndice G

Tabela 12 – Contagem bacteriana das amostras provenientes dos implantes de conexão do tipo hexágono interno após simulação de carga cíclica.

	HI Carga 1	HI Carga 2	HI Carga 3	HI Carga 4	HI Carga 5	HI Carga 6	HI Carga 7	HI Carga 8	HI Carga 9	HI Carga 10	10x5	10x6
Aa a	515478,28	576040,03	564707,59	608823,53	609360,67	572293,94	475283,70	500391,03	488294,72	403025,01	100000,00	1000000,00
Aa b	460458,05	403531,64	446463,41	438318,98	477529,95	408126,18	433374,78	455261,83	438776,78	357386,57	100000,00	1000000,00
<i>B. fragilis</i>	333295,99	310352,07	310942,41	297399,47	386519,90	337931,51	332184,19	381615,81	355271,12	351136,12	100000,00	1000000,00
<i>C. gingivalis</i>	356143,11	340094,93	313177,33	338786,93	273053,38	321414,19	305441,00	370913,82	334148,80	328798,24	100000,00	1000000,00
<i>E. faecalis</i>	238286,97	170821,64	265714,68	246311,06	186387,61	86942,76	75018,24	147929,17	158557,91	236402,59	100000,00	1000000,00
<i>E. corrodens</i>	305777,59	347337,71	224165,02	312345,45	352153,74	333384,93	373548,99	312965,44	390520,61	259768,55	100000,00	1000000,00
<i>P. gingivalis</i>	307623,60	287765,67	331643,56	138886,59	120565,12	79194,22	104606,75	163973,00	216327,54	137923,04	100000,00	1000000,00
<i>P. melaninogenica</i>	261643,34	362666,50	370142,11	307290,50	201858,53	292364,57	186918,66	155347,23	233627,03	156731,08	100000,00	1000000,00
<i>P. intermedia</i>	457283,12	252411,53	310710,46	365827,48	265488,83	281868,38	322507,67	298656,88	166327,38	140913,11	100000,00	1000000,00
<i>P. putida</i>	260687,63	418402,63	468512,66	292419,51	352342,09	371560,84	316000,85	270612,67	295442,71	268771,89	100000,00	1000000,00
<i>S. aureus</i>	303329,90	266059,99	284358,79	184482,30	315181,18	213791,78	292331,44	240310,00	300654,62	274647,39	100000,00	1000000,00
<i>S. constellatus</i>	302956,69	322616,67	289803,52	328288,12	143244,82	182011,07	180974,27	176952,63	5459,25	114541,38	100000,00	1000000,00
<i>S. mutans</i>	287606,10	256015,49	241385,17	232552,74	342800,72	330936,37	351662,80	406272,32	711975,22	360281,59	100000,00	1000000,00
<i>S. oralis</i>	228793,57	144222,33	170688,23	60196,08	131567,07	107220,99	168914,59	138866,54	300119,22	163220,47	100000,00	1000000,00
<i>S. sanguinis</i>	106019,38	159403,75	208881,58	147005,73	131415,34	147727,74	179572,98	111063,00	205469,46	185485,10	100000,00	1000000,00
<i>S. sobrinus</i>	234257,48	229959,42	212986,93	233506,70	235225,40	262849,31	223750,82	277368,01	224635,03	311671,40	100000,00	1000000,00
<i>S. salivarius</i>	174157,02	231743,53	220543,63	257261,57	270955,37	282291,29	229249,62	261784,60	272094,19	290340,67	100000,00	1000000,00
<i>S. parasanguinis</i>	162922,24	198230,17	176975,30	143963,34	185760,65	205127,64	402212,31	221573,46	306125,51	180154,60	100000,00	1000000,00
<i>S. moreel</i>	222574,50	151448,54	117319,56	126345,57	136480,76	111236,52	118222,94	153194,27	140408,22	139857,12	100000,00	1000000,00
<i>T. denticola</i>	277947,89	238940,09	204643,68	206351,92	220333,48	203354,01	219899,23	188275,48	206108,64	190131,96	100000,00	1000000,00
<i>T. forsythensis</i>	197710,46	173194,34	127411,15	144544,09	120491,00	159019,20	83046,69	128338,95	154537,15	160941,07	100000,00	1000000,00
<i>V. parvula</i>	189589,57	173850,08	268469,31	224524,28	181333,53	166313,43	187331,98	213995,82	225995,34	176564,60	100000,00	1000000,00
<i>F. nucleatum</i>	232611,16	182028,51	167435,69	171016,10	138489,83	156735,44	153664,28	153433,20	197463,68	121576,63	100000,00	1000000,00
<i>F. periodonticum</i>	180964,68	171391,92	136081,39	150565,21	214627,15	190479,88	279572,41	154545,87	203939,99	220782,56	100000,00	1000000,00
<i>P. endodontalis</i>	344411,30	231583,08	290018,91	224283,61	315869,18	201833,25	165692,57	237523,10	144213,61	207746,24	100000,00	1000000,00
<i>P. micros</i>	180004,61	261576,20	317889,59	277919,11	303982,15	241238,67	169761,30	134408,90	151322,97	228329,67	100000,00	1000000,00
<i>N. mucosa</i>	215138,14	180018,56	206648,40	197952,00	169394,19	35881,39	214692,55	201642,28	173260,61	196413,80	100000,00	1000000,00
<i>P. aeruginosa</i>	238434,34	187240,42	228221,54	199550,37	195205,22	254162,50	247487,38	201710,30	277278,20	224508,59	100000,00	1000000,00
<i>S. gordoni</i>	331029,67	337681,25	371666,35	493219,75	368035,37	461630,01	41775,67	303925,47	491810,61	395388,96	100000,00	1000000,00
<i>S. mitis</i>	289887,24	442209,82	314857,67	422021,41	332533,86	419694,06	345124,59	444590,37	327429,21	399692,25	100000,00	1000000,00
<i>L. casei</i>	521830,75	521688,62	603706,66	508569,46	317074,28	305087,84	319242,93	372032,59	378266,48	376169,33	100000,00	1000000,00
<i>S. pasteurii</i>	431737,17	366129,19	389398,36	314946,61	378851,59	283604,52	312985,49	346568,61	321419,42	337355,99	100000,00	1000000,00

9. 8 Apêndice H

Tabela 13 – Contagem bacteriana das amostras provenientes dos implantes de conexão do tipo cone morse sem aplicação de carga cíclica (controle).

	CM Controle 1	CM Controle 2	CM Controle 3	CM Controle 4	CM Controle 5	CM Controle 6	CM Controle 7	CM Controle 8	CM Controle 9	CM Controle 10	10x5	10x6
<i>A.a</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>A.b</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>B.fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>C.gingivalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>E.faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>E.corrodens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.gingivalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.melaninogenica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.itermedia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.putida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.constellatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.soralis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.sanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.sobrinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.salivarius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.parasanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.morei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>T.denticola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>T.forsythensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>V.parvula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>F.nucleatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>F.periodonticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.endodontalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.micros</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>N.mucosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.gordonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.mitis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>L.casei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00
<i>S.pasteuri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 100000,0010000000,00

9. 9 Apêndice I

Tabela 14 – Contagem bacteriana das amostras provenientes dos implantes de conexão do tipo cone morse após simulação de carga cíclica.

	CM Carga 1	CM Carga 2	CM Carga 3	CM Carga 4	CM Carga 5	CM Carga 6	CM Carga 7	CM Carga 8	CM Carga 9	CM Carga 10	10x5	10x6
<i>A.a</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	53169,40	91683,28	100000,00	1000000,00
<i>A.a</i>	0	0	0	0	0	0	725524,11	234122,31	290212,38	235463,01	100000,00	1000000,00
<i>B.fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>C.gingivalis</i>	0	0	0	0	0	0	2932122,05	126469,04	360317,00	293836,01	100000,00	1000000,00
<i>E.faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>E.corrodens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.gingivalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.melaninogenica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.intermedia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.putida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.constelatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.oralis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.sanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.sobrinus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.salivarius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.parasanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.morei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>T.denticola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>T.forsythensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>V.parvula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>F.nucleatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>F.periodonticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.endodontalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.micros</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>N.mucosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100000,00	1000000,00
<i>S.gordonii</i>	0	0	0	0	0	177185,66	320205,60	195206,39	111982,21	132675,43	100000,00	1000000,00
<i>S.mitis</i>	0	0	122337,11	0	0	167756,43	250598,65	114678,61	115929,35	123256,98	100000,00	1000000,00
<i>L.casei</i>	0	0	0	98916,37	0	127987,34	321786,21	111687,87	113654,98	112673,98	100000,00	1000000,00
<i>S.pasteuri</i>	293251,55	359863,60	89942,31	252559,24	0	132456,76	276542,37	138765,21	146546,56	147675,12	100000,00	1000000,00

9. 10 Apêndice J

Tabela 15 – Média da Contagem bacteriana, Erro padrão (EPM) e Desvio padrão (DP) das médias das amostras provenientes do interior dos implantes dos 3 tipos de conexões avaliadas sem aplicação de carga cíclica (Controle).

Espécies bacterianas	HE Controle		DP		HI Controle		EPM		DP		CM Controle		EPM		DP	
<i>Aa ATCC</i>	0	±	0	0	350223,49	±	143716	454470	118330,24	±	11830	374193				
<i>Aa JP2</i>	0	±	0	0	259193,48	±	109270	345542	507513,11	±	507513	1604897				
<i>B.fragilis</i>	0	±	0	0	220977,05	±	115609	365587	561824,67	±	561825	1776646				
<i>C.gingivalis</i>	0	±	0	0	533748,51	±	365909	1157107	0	±	0	0				
<i>E.faecalis</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>E.corrodens</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.gingivalis</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.melaninogenica</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.itermedia</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.putida</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>S.aureus</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>S.constelatus</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>S.mutans</i>	0	±	0	0	39176,32	±	39176	123886	0	±	0	0				
<i>S.oralis</i>	0	±	0	0	47528,98	±	47529	150300	0	±	0	0				
<i>S.sanguinis</i>	0	±	0	0	35898,75	±	35899	113522	0	±	0	0				
<i>S.sobrinus</i>	0	±	0	0	30453,41	±	30453	96302	0	±	0	0				
<i>S.salivarius</i>	0	±	0	0	30497,74	±	30948	97865	0	±	0	0				
<i>S.parasanguinis</i>	0	±	0	0	37580,65	±	37581	118840	0	±	0	0				
<i>S.moreei</i>	0	±	0	0	33976,79	±	33977	107444	0	±	0	0				
<i>T.denticola</i>	0	±	0	0	31605,92	±	31606	99947	0	±	0	0				
<i>T.forsythensis</i>	0	±	0	0	29107,22	±	29107	92045	0	±	0	0				
<i>V.parvula</i>	0	±	0	0	19548,51	±	19549	61818	0	±	0	0				
<i>F.nucleatum</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>F.periodonticum</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.endodontalis</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.micros</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>N.mucosa</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>P.aeruginosa</i>	0	±	0	0	0	±	0	0	0	±	0	0				
<i>S.gordonii</i>	16809,31	±	2.7	8664,6	26878,49	±	26878	84997	16007,52	±	16008	50620				
<i>S.mitis</i>	14726,22	±	3.1	9854,6	18624,37	±	18624	58895	305296,98	±	305297	965434				
<i>L.casei</i>	19607,09	±	3.1	10073	31161,03	±	31161	98540	253444,39	±	253444	801462				
<i>S.pasteuri</i>	15652,55	±	2.55	8126,9	29253,72	±	29254	92508	460614,94	±	460615	1456592				

9. 11 Apêndice K

Tabela 16 – Média da Contagem bacteriana, Erro padrão (EPM) e Desvio padrão (DP) das médias das amostras provenientes do interior dos implantes dos 3 tipos de conexões avaliadas após simulação de carga cíclica.

Espécies bacterianas	HE Carga			HI Carga			CM Carga			DP
	HE Carga	EPM	DP	HI Carga	EPM	DP	CM Carga	EPM	DP	
Aa ATCC	488419,36	± 18552	58665	531718,23	± 20321	99959	156942,87	± 141199	446510	
Aa JP2	339411,91	± 40014	126534	431872,34	± 18761	101234	148532,18	± 74554	235760	
B.fragilis	322996,11	± 42896	135649	339234,98	± 9786	109287	0	± 0	0	
C.gingivalis	466066,68	± 19592	61956	328123,45	± 8232	546789	371274,41	± 287732	909887	
E.faecalis	219208,87	± 32684	103357	181987,35	± 21765	99876	0	± 0	0	
E.corrodens	246841,85	± 27997	88533	321574,21	± 15467	79852	0	± 0	0	
P.gingivalis	248602,71	± 31820	100623	188076,12	± 28761	98720	0	± 0	0	
P.melaninogenica	248383,56	± 28768	90972	252872,98	± 25421	67982	0	± 0	0	
P.itermedia	259841,36	± 31610	99959	286237,67	± 28721	98789	0	± 0	0	
P.putida	259644,97	± 31550	99770	331232,65	± 22962	102343	0	± 0	0	
S.aureus	264291,69	± 32902	104044	267204,65	± 13431	103567	0	± 0	0	
S.constelatus	271364,19	± 33474	105856	204563,78	± 33276	100243	0	± 0	0	
S.mutans	390024,11	± 16694	52792	352897,14	± 43765	48974	0	± 0	0	
S.oralis	300987,41	± 10076	31863	161765,98	± 20398	29432	0	± 0	0	
S.sanguinis	340631,96	± 15443	48836	158987,98	± 11789	176329	0	± 0	0	
S.sobrinus	354823,64	± 21937	69372	244564,76	± 9567	43786	0	± 0	0	
S.salivarius	303139,85	± 27856	88089	249872,76	± 11243	79632	0	± 0	0	
S.parasanguinis	278490,07	± 21094	66706	218141,25	± 24532	181183	0	± 0	0	
S.morei	372169,14	± 11959	37816	141342,78	± 11234	42367	0	± 0	0	
T.denticola	282727,16	± 35052	110845	215456,19	± 8796	99821	0	± 0	0	
T.forsythensis	283164,66	± 32520	102836	144543,28	± 10245	98734	0	± 0	0	
V.parvula	285003,22	± 38765	122585	200387,69	± 11321	109879	0	± 0	0	
F.nucleatum	275791,99	± 36008	113866	167897,09	± 9789	111234	0	± 0	0	
F.periodonticum	314774,74	± 38327	121200	190876,21	± 13476	107689	0	± 0	0	
P.endodontalis	317787,98	± 42813	135387	236754,87	± 20321	104576	0	± 0	0	
P.micros	289653,3	± 47953	181183	226573,69	± 21145	111879	0	± 0	0	
N.mucosa	293677,07	± 35143	111132	179890,07	± 16875	97472	0	± 0	0	
P.aeruginosa	347884,15	± 44162	139653	225221,71	± 9824	116907	0	± 0	0	
S.gordonii	316621,12	± 37279	117886	397324,27	± 21365	124567	93725,52	± 35642	112709	
S.mitis	460838,06	± 21743	68757	373298,19	± 18762	46873	89455,71	± 27420	86710	
L.casei	374632,39	± 25119	79434	422352,76	± 33981	65894	88670,67	± 31477	99540	
S.pasteuri	331509,43	± 15106	47770	348764,62	± 13625	111132	183760,27	± 34360	108656	

9. 12 Apêndice L

Tabela 17 – Média da Contagem bacteriana e Desvio padrão (DP) das médias das amostras provenientes da saliva antes e após o ensaio de simulação de carga cíclica.

Espécies bacterianas	Saliva Inicial	DP	Saliva Final	DP
<i>Aa ATCC</i>	2612114,2 ±	21567	577204,75 ±	147796
<i>Aa JP2</i>	3444184,81 ±	12453	435876,27 ±	155040
<i>B.fragillis</i>	2606330,74 ±	9876	423612,45 ±	185315
<i>C.gingivalis</i>	3062945,89 ±	8756	499757,29 ±	272481
<i>E.faecalis</i>	1178398,75 ±	197620	263490,14 ±	155434
<i>E.corrodens</i>	1032649,13 ±	125504	272160,50 ±	133498
<i>P.gingivalis</i>	811831,00 ±	38029	235694,56 ±	130817
<i>P.melaninogenica</i>	1130121,35 ±	266945	296307,17 ±	145484
<i>P.itermedia</i>	670493,14 ±	113353	351522,45 ±	141665
<i>P.putida</i>	558808,9 ±	136338	343566,31 ±	128542
<i>S.aureus</i>	681667,32 ±	165882	319258,24 ±	135844
<i>S.constelatus</i>	564250,1 ±	195867	286347,28 ±	171229
<i>S.mutans</i>	315827,05 ±	142839	289722,25 ±	131940
<i>S.oralis</i>	1306093,98 ±	23476	307462,25 ±	107356
<i>S.sanguinis</i>	652293,09 ±	348761	310539,02 ±	162556
<i>S.sobrinus</i>	608004,60 ±	224538	405669,3 ±	277452
<i>S.salivarius</i>	340029,73 ±	162648	438735,52 ±	446807
<i>S.parasanguinis</i>	405640,68 ±	316621	439614,00 ±	519565
<i>S.moreei</i>	1202533,68 ±	212082	357453,36 ±	319754
<i>T. denticola</i>	952132,78 ±	110537	391027,21 ±	509467
<i>T.forsythensis</i>	275265,8 ±	69884	482431,36 ±	656506
<i>V.parvula</i>	360022,11 ±	180436	425793,40 ±	566064
<i>F.nucleatum</i>	652541,04 ±	335432	522330,49 ±	605270
<i>F.periodonticum</i>	490740,14 ±	200721	423077,72 ±	346167
<i>P.endodontalis</i>	768094,20 ±	148061	418063,22 ±	202232
<i>P.micros</i>	970831,83 ±	211735	387463,2 ±	248945
<i>N.mucosa</i>	904666,53 ±	125996	357970,33 ±	165833
<i>P.aeruginosa</i>	1059091,78 ±	432211	457487,21 ±	375453
<i>S.gordonii</i>	1804434,43 ±	21346	487839,34 ±	263204
<i>S.mitis</i>	1426089,45 ±	507490	471707,4 ±	237090
<i>L.casei</i>	1546115,74 ±	623479	480972,21 ±	317593
<i>S. pasteurii</i>	1203261,60 ±	227869	429573,73 ±	238001

9. 13 Apêndice M

Tabela 18 – Média da Incidência (%) das espécies bacterianas nas amostras provenientes do interior dos implantes dos 3 tipos de conexões avaliados com ou sem a simulação de carga cíclica.

	HE Controle	HE Carga	HI Controle	HI Carga	CM Controle	CM Carga
<i>Aa ATCC</i>	0	100	40	100	10	30
<i>Aa JP2</i>	0	90	40	100	10	40
<i>B.fragilllis</i>	0	90	30	100	10	0
<i>C.gingivalis</i>	0	100	30	100	0	40
<i>E.faecalis</i>	0	90	0	100	0	0
<i>E.corrodens</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.gingivalis</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.melaninogenica</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.itermedia</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.putida</i>	0	90	0	100	0	0
<i>S.aureus</i>	0	90	0	100	0	0
<i>S.constelatus</i>	0	90	0	100	0	0
<i>S.mutans</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.oralis</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.sanguinis</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.sobrinus</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.salivarius</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.parasanguinis</i>	0	100	10	100	0	0
<i>S.moreei</i>	0	100	10	100	0	0
<i>T. denticola</i>	0	90	10	100	0	0
<i>T.forsythensis</i>	0	90	10	100	0	0
<i>V.parvula</i>	0	90	10	100	0	0
<i>F.nucleatum</i>	0	90	0	100	0	0
<i>F.periodonticum</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.endodontalis</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.micros</i>	0	90	0	100	0	0
<i>N.mucosa</i>	0	90	0	100	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	0	90	0	100	0	0
<i>S.gordonii</i>	30	90	10	100	10	50
<i>S.mitis</i>	20	100	10	100	10	60
<i>L.casei</i>	30	100	10	100	10	60
<i>S. pasteurii</i>	20	100	10	100	10	90

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Cássio do Nascimento

Assinatura: _____

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Av. Café, s/ n° 14090-904

E-mail: cassionasc@forp.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP / 212 / FORP

Ribeirão Preto, 21 de maio de 2010


Ref. processo n.º 2010.1.519.58.0
CAAE n.º 0028.0.138.000-10

Senhor Pesquisador,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 109.^a sessão, realizada em 20/05/2010, **aprovou** o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado "Avaliação da infiltração bacteriana através da interface implante-conector protético submetidos à aplicação de carga – avaliação *in vitro* pelo método DNA Checkerboard".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de ser entregue, na secretaria do CEP, o **Relatório Final** em 20/05/2011, com o respectivo formulário preenchido pelo pesquisador responsável.

Lembramos ainda que, quando da submissão do Relatório Final a este Comitê, quaisquer inclusões ou modificações no projeto original deverão ser comunicadas e justificadas ao CEP, através do formulário supracitado.


JULIANA GODOI DE OLIVEIRA SILVA
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. VINÍCIUS PEDRAZZI
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
desta Faculdade