



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



**ALICE RAMOS DE FREITAS PEREIRA**

**Comunidades microbianas presentes em conectores protéticos de titânio e zircônia utilizados em restaurações implantossuportadas: biodiversidade e relação com os achados clínicos após 3 anos de função**

**Ribeirão Preto**

**2022**



ALICE RAMOS DE FREITAS PEREIRA

**Comunidades microbianas presentes em conectores protéticos de titânio e zircônia utilizados em restaurações implantossuportadas: biodiversidade e relação com os achados clínicos após 3 anos de função**

**Versão Corrigida**

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

**Área de Concentração:** Reabilitação Oral.

**Orientador:** Prof. Dr. Cássio do Nascimento

**Ribeirão Preto**

**2022**

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Pereira, Alice Ramos de Freitas

Comunidades microbianas presentes em conectores protéticos de titânio e zircônia utilizados em restaurações implantossuportadas: biodiversidade e relação com os achados clínicos após 3 anos de função.

163p. : il. ; 30 cm

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

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

Orientador: do Nascimento, Cássio

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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**ALICE RAMOS DE FREITAS PEREIRA**

**Comunidades microbianas presentes em conectores protéticos de titânio e zircônia utilizados em restaurações implantossuportadas: biodiversidade e relação com os achados clínicos após 3 anos de função.**

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

Área de concentração: Reabilitação Oral.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



*Dedicatória*

---





### *A Deus*

*Por estar sempre presente nas alegrias e me dar forças nos momentos difíceis. Por guiar meus passos quando me sinto sem orientação. E por me mostrar todos os dias que as barreiras colocadas no meu caminho, sou capaz de ultrapassá-las.*

### *Aos meus pais*

*Célio Carvalho de Freitas (in memoriam), te perder de forma tão repentina e inesperada foi o acontecimento mais difícil, a maior dor que já senti na vida. O amor pelos estudos, leitura e busca por conhecimentos foi a maior herança que o senhor poderia ter me deixado. Sem o seu incentivo, jamais teria chegado até aqui. Obrigada por ser meu exemplo de vida, de amor ao próximo, a Deus e por todo companheirismo e ensinamentos. **Maria Avani Ramos de Freitas**, minha mãezinha, meu maior exemplo de fé, amor e dedicação a família, obrigada por todo incentivo, sem o seu apoio jamais teria conseguido, obrigada por tudo que ainda faz por mim. Essa conquista é resultado do esforço de vocês. A vocês todo o meu amor, respeito e eterna gratidão.*

### *Ao meu marido e filhos*

***Samuel Mateus**, minha vida, meu melhor amigo, meu confidente e meu porto seguro, você foi o maior incentivador para que eu realizasse esse sonho, muito obrigada! O seu amor, a sua paciência, o seu cuidado infinito, o seu incentivo constante e o seu conforto foram fundamentais para que essa fase fosse realizada da melhor maneira possível. Obrigada por sempre acreditar em mim e buscar tornar os meus sonhos os seus também! Amo muito você!*

***Miguel e Clarice**, vocês são o motivo da minha existência, por vocês enfrento o que for preciso para provar que sempre podemos mais, que nunca podemos desistir dos nossos sonhos. Juntos trilhamos essa conquista, vocês foram incríveis! Obrigada por trazerem mais alegria e sentido a minha vida, amo muito vocês, meus pequenos!*

### *Aos meus irmãos*

***Aline e Saulo**, meus irmãos, meus amigos, com quem eu posso sempre contar, obrigada por sempre acreditarem em mim, e me incentivarem nessa caminhada!*

*À vocês, amada família, dedico esta vitória!*



*Agradecimentos especiais*

---



## ***Agradecimentos Especiais***

*Ao Professor. Dr. Cássio do Nascimento, agradeço a Deus por ter me dado a honra de ser sua orientanda novamente. Sua competência profissional, humildade, paciência e apoio foram fundamentais para que eu não desistisse nos momentos de dificuldade. Agradeço por toda dedicação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, incentivo e conselhos. Reconheço o esforço em formar orientados resolutivos, preparados para seguirem a carreira acadêmica. O aprendizado é contínuo, levarei para a vida todos os ensinamentos. Muito obrigada por tudo!!!*

*A pós-graduanda Millena Rocha, minha amiga-irmã, obrigada por todo incentivo, pelas inúmeras vezes que me deu abrigo em Ribeirão. Obrigada por ser minha família em Ribeirão, sua amizade amenizou a saudade de casa e tornou a vida de uma pós-graduanda gestante mais tranquila. Obrigada por todas as vezes que me incentivou a não desistir, que amenizou a saudade do filho recém-nascido e me fez acreditar que eu conseguiria. Certamente a vida tem reservado o melhor para você, e estarei na primeira fileira para aplaudir!*

*À equipe do Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular (LabDOM), especialmente o meu grande amigo-irmão Thalisson Saymo, obrigada por me ajudar em todos os experimentos como se fossem seus, por torná-los mais divertidos, por todas risadas e momentos de descontração. Mesmo a distância, tenha em mente que sempre pode contar comigo! E meu amigo, companheiro de disciplinas e experimentos, Jefferson Antônio Gomes, sua dedicação aos estudos me inspira, obrigada pela amizade e experiência compartilhada. Chegou a hora de cada um desbravar novos caminhos, ainda que em lugares distantes, saibam que sempre podem contar comigo! Certamente Deus tem reservado o que há de melhor para vocês!*

*Aos voluntários da pesquisa, pela confiança e compromisso com o estudo.*



*Agradecimientos*

---





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

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

*À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), pela oportunidade de aprendizado e acolhimento, essenciais para o meu crescimento profissional.*

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

*À Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis, chefe do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e suporte durante os anos de pós-graduação.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pelos suportes financeiros para o desenvolvimento da pesquisa, nas modalidades de Auxílio à Pesquisa (Processo MCTI/CNPq/Universal 457941/2014-6; e Processo FAPESP 2014/22876-8) e Bolsa de Estudos no País – Mestrado (Processo FAPESP 2016/13203-5).*

*Aos Docentes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP – USP, sou encantada com a competência, paciência, dedicação e amor com que exercem a profissão. Obrigada por todos os ensinamentos.*

*Aos Professores da Disciplina de Materiais Dentários, Cássio do Nascimento, Andréa Cândido dos Reis e Alma Blásida Concepcion Elizaur Benitez Catirse que através do Programa PAE, pude aprender sobre as responsabilidades e vida diária na docência.*

*Aos Funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela inestimável disponibilidade, eficiência e colaboração durante o período do mestrado em Reabilitação Oral.*

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

*Ao **Emerson de Souza Santos**, técnico do Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos, ao **Prof. Sérgio Akira Uyemura**, responsável pelo laboratório, e a **Viviane de Cássia Oliveira**, técnica do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral, muito obrigada por sempre não medir esforços para ajudar.*

*Aos meus amigos da pós-graduação, **Jefferson, Lívia Fiorin, Aninha, Marília, Cecília, Raony, Geyson, Michelli e Andrezza**. Nunca imaginei que encontraria pessoas tão especiais nessa trajetória, amigos sinceros e sempre dispostos a ajudar, ensinar e compartilhar. Vocês tornaram a trajetória mais fácil e me fizeram crescer como ser humano e profissional. A vocês desejo todo sucesso do mundo, estarei sempre na torcida! Muito obrigada!*

*À **toda minha família e amigos de Fortaleza e Sobral**. Apesar da distância, vocês se fizeram presentes e me abençoaram através das palavras de ânimo, e carinho. O apoio sincero, o braço de suporte, a saudade apertada e o incentivo de vocês foi a minha base para realizar este trabalho da melhor maneira possível!*

*Aos meus **alunos** por serem meu incentivo a buscar cada vez mais conhecimento.*

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

***Meus sinceros agradecimentos!***

*“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam  
um pouco de si, levam um pouco de nós”*

*Antoine de Saint-Exupéry*



*Resumo*

---



Pereira, ARF. **Comunidades microbianas presentes em conectores protéticos de titânio e zircônia utilizados em restaurações implantossuportadas: biodiversidade e relação com os achados clínicos após 3 anos de função.** [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

Com alta previsibilidade de sucesso e sobrevivência, o tratamento com implantes dentários é uma prática relevante da clínica odontológica. O material utilizado para confecção do conector protético parece ter papel importante no resultado clínico dos implantes em longo prazo. A infecção que resulta em um processo inflamatório nos tecidos peri-implantares continua a ser a principal limitação para o sucesso em longo prazo das restaurações suportadas por implantes. Mudanças nas comunidades microbianas são comuns ao longo do tempo, mas podem perturbar a homeostase do microbioma hospedeiro e resultar em inflamação dos tecidos peri-implantares se um biofilme disbiótico for estabelecido. Considerando que diferentes superfícies de substrato oral podem ter um impacto relevante na adesão e colonização microbiana, o objetivo deste estudo foi investigar longitudinalmente as comunidades microbianas do biofilme formado sobre próteses unitárias de implantes com conectores de titânio ou zircônia e sua correlação com as condições clínicas e radiológicas peri-implantares durante 3 anos de função. Vinte indivíduos saudáveis foram selecionados e reabilitados com implantes dentários e restaurações protéticas unitárias cimentadas sobre conectores de zircônia (n=10; região anterior da maxila) ou conectores de titânio (n=10; região posterior da maxila/mandíbula). Amostras de biofilmes supra e subgingival/submucoso e parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, recessão gengival, sangramento à sondagem e reabsorção óssea marginal) foram coletados dos sítios associados aos implantes e dentes contralaterais nos períodos T0 = *baseline* (instalação da prótese), T1 = 12 meses, T2 = 24 meses e T3 = 36 meses de função mastigatória. O sequenciamento do gene rRNA 16S foi usado para caracterizar os biofilmes orais. Análise de bioinformática e estatística multivariada foram usadas para avaliar a diversidade microbiana e os resultados clínicos. Os microbiomas de ambos os materiais apresentaram altos níveis de diversidade alfa durante todo o período experimental, independentemente do tempo de amostragem. As comunidades microbianas de titânio e zircônia foram bastante diferentes ao longo do tempo, diferindo em cerca de 30% após 3 anos de carga funcional. A similaridade do microbioma entre os conectores testados e os dentes contralaterais também foi baixa, variando entre 45% e 50% após 3 anos de investigação. Patógenos periodontais comumente associados à peri-implantite foram encontrados em ambos os grupos. A profundidade de sondagem aumentou nos implantes associados aos conectores de

titânio após 12 meses, enquanto nos implantes com zircônia reduziu no mesmo período. A recessão gengival e o sangramento à sondagem aumentaram ao longo do tempo para ambos materiais. Não houve diferença significativa nos valores da reabsorção óssea marginal, entre os dois substratos, após 36 meses. Não foi observada nenhuma complicação técnica ou biológica para ambos os conectores, com taxa de sucesso de 100%. Os resultados sugerem a manutenção da saúde peri-implantar ao longo do tempo, em ambos os grupos. Além disso, os conectores de titânio e zircônia mostraram fortes correlações de índices de diversidade e taxa microbiana com os resultados clínicos. De modo geral, pode-se concluir que o tipo de substrato usado como conector protético influenciou de forma significativa a diversidade e contagem de comunidades bacterianas durante 3 anos de função mastigatória. O tempo de amostragem não teve efeito sobre as variáveis. Fortes correlações foram encontradas entre os achados microbianos e os resultados clínicos.

**Palavras-chave:** Implante dentário; Zircônia; Titânio; Conectores Protéticos; Avaliação clínica; Microbiologia.



*Abstract*

---



Pereira, ARF. **Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: Biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year of function.** [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

With high predictability of success and survival, treatment with dental implants is a relevant practice in the dental clinic. The materials employed for manufacturing implant components may influence the microbial adhesion and biofilm formation on dental implant assemblies. Infection resulting in an inflammatory process of the peri-implant tissues remains the major limitation to the long-term success of implant-supported restorations in dentistry. Shifts in microbial communities are common over time, but they may disturb the host-microbiome homeostasis and result in inflammation of the periimplant issues if a dysbiotic biofilm is established. Considering that different oral substrate surfaces may have a relevant impact on the microbial adhesion and colonization, the aim of this study was to investigate the microbial communities of the biofilm formed on single-implant restorations using titanium or zirconia abutments and how they correlate with clinical parameters after 3-years of implant loading. Twenty healthy subjects were selected and rehabilitated with single-unit implant restorations cemented on zirconia (n = 10; anterior maxilla) or titanium abutments (n = 10; posterior mandible). Supra and subgingival biofilm samples, and clinical parameters data (probing depth, gingival recession, bleeding on probing, and marginal bone level) were collected from the peri-implant sites and contralateral teeth in periods different time-periods, at the prosthesis installation (T0) and after 12 (T1), 24 (T2) and 36 (T3) months of loading. MiSeq sequencing of 16S rRNA amplicons was used to characterize the oral biofilms of individuals. Bioinformatics analysis and multivariate statistical analysis were used to evaluate the microbial diversity and clinical outcomes. Microbiomes of both abutment materials presented high alpha-diversity indices during all the experimental period, irrespective of the time of sampling. Microbial communities of titanium and zirconia were quite different over time, differing about 30% after 3 years of functional loading. Similarity of microbiomes between tested abutments and contralateral teeth was also low, ranging between 45% and 50% after 3 years of investigation. Periodontal pathogens commonly associated with periimplantitis were found in both groups. The probing depth increased in implants associated with titanium connectors after 12 months, while in implants with zirconia it decreased in the same period. Gingival recession and probing bleeding increased over time for both materials. There was no significant difference in marginal bone resorption values between the two substrates after 36 months. No technical or

biological complications were observed for both connectors, with a success rate of 100%. The results suggest the maintenance of peri-implant health over time in both groups. Furthermore, both abutment materials presented strong correlations of diversity indices and microbial taxa with clinical outcomes. Overall, it can be concluded that the type of abutment substrate significantly influenced diversity and clustering of communities during 3 years of functional loading. The time of sampling had no effect on the variables. Large correlations were found between microbial findings and clinical outcomes.

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

## *Lista de Figuras*

---



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Fluxograma do estudo.....	<b>61</b>
<b>Figura 2-</b>	Guias cirúrgicos confeccionados para auxílio no posicionamento correto dos implantes. A: Guia cirúrgico representativo para instalação de implante na região anterior de maxila (Grupo 1 - Zircônia); B: Guia cirúrgico representativo para instalação de implante na região posterior de mandíbula (Grupo 2 - Titânio).....	<b>63</b>
<b>Figura 3-</b>	Restaurações protéticas utilizadas na restauração dos conectores de titânio (Grupo 1) ou zircônia (Grupo 2). A: Coroas metalocerâmicas (liga de cobalto-cromo folheada com porcelana feldspática) utilizadas no grupo 1. Coroas totalmente de cerâmica (CAD-CAM Lava Frame cerâmica e Lava Ceram folheada cerâmica, 3M ESPE) utilizadas no grupo 2.....	<b>64</b>
<b>Figura 4-</b>	Imagem representativa da coleta do biofilme supra gengival na superfície externa das coroas protéticas e dentárias, com o auxílio de uma escova do tipo <i>microbrush</i> e armazenada em microtubo. A: coleta na região vestibular; B: coleta na região palatina; C: armazenamento da amostra em tubo individual contendo 150 µL de TE.....	<b>65</b>
<b>Figura 5-</b>	Imagem representativa da coleta do biofilme subgengival/submucoso na superfície externa das coroas protéticas e dentárias, com o auxílio de cones de papel esterilizados e armazenados em microtubo. A: coletas no sulco vestibular (regiões central, mesial e distal); B: coletas no sulco palatino (regiões central, mesial e distal); C: cones contendo o biofilme sendo armazenados em um mesmo tubo individual contendo 150 µL de TE.....	<b>65</b>
<b>Figura 6-</b>	Divisão e homogeneização das amostras. A: Imagem ilustrando parte das amostras de biofilme coletadas, após homogeneizadas, sendo agrupadas de acordo com a biblioteca correspondente. B: Tubos tipo Eppendorf contendo as 360 amostras agrupadas em 24 bibliotecas de acordo com o sítio de coleta.....	<b>67</b>
<b>Figura 7-</b>	Extração e purificação das amostras. A: microtubos contendo as amostras foram centrifugados a 13200 rpm durante 7 minutos para precipitar as células e remover o conteúdo sobrenadante; B: Microtubos incubados a 65°C em banho maria durante 30 minutos, após adição de 700 µL do tampão CTAB de extração com proteinase K (100mg/mL).....	<b>68</b>

<b>Figura 8-</b>	Extração e purificação das amostras. A: Microtubos após serem centrifugados a 13200 rpm por 7 minutos para formação de duas fases (fase aquosa e orgânica). B: Remoção cuidadosa da fase aquosa do microtubo.....	<b>69</b>
<b>Figura 9-</b>	Imagem representativa dos microtubos contendo as amostras e beads posicionados na estante magnética.....	<b>71</b>
<b>Figura 10-</b>	Imagem representativa atraído pela estante magnética após remoção do sobrenadante.....	<b>71</b>
<b>Figura 11-</b>	Equação gráfica para o cálculo da concentração dos DNAs amplificados.....	<b>73</b>
<b>Figura 12-</b>	Protocolo de ciclagem utilizado para amplificação das amostras.....	<b>74</b>
<b>Figura 13-</b>	Fluxograma contendo os dados de seleção, alocação e seguimento e análise do estudo.....	<b>80</b>
<b>Figura 14</b>	Imagem representativa da avaliação da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival por meio do sistema Florida Probe.....	<b>77</b>
<b>Figura 15</b>	A: Técnica do paralelismo para obtenção de radiografias periapicais; B: Mensuração do nível ósseo marginal (região mesial e distal) por meio do Software ImageJ-Fiji 1.43.....	<b>77</b>
<b>Figura 16-</b>	Análise das amostras do DNA genômico do grupo Titânio em gel de agarose 0,8%. $\lambda$ : marcador de peso molecular fago lambda digerido com HindIII.....	<b>83</b>
<b>Figura 17-</b>	Análise das amostras do DNA genômico do grupo Zircônia em gel de agarose 0,8%. $\lambda$ : marcador de peso molecular fago lambda digerido com HindIII.....	<b>83</b>
<b>Figura 18-</b>	Imagem da análise das amostras dos genes 16S rRNA amplificados do DNA genômico das bibliotecas (amostras) 1 a 8 (T1= 1 ano após instalação da prótese) em gel de agarose 0,8%. $\lambda$ : marcador de peso molecular Ladder 1Kb.....	<b>88</b>
<b>Figura 19-</b>	Imagem da análise das amostras dos genes 16S rRNA amplificados do DNA genômico das amostras 9 a 24 (T2 e T3 - 1 e 2 anos após instalação da prótese, respectivamente) em gel de agarose 0,8%. $\lambda$ : marcador de peso molecular Ladder 1Kb.....	<b>88</b>
<b>Figura 20</b>	Abundância relativa da distribuição filogenética das amostras supra e subgengivais associadas a implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle).....	<b>90</b>



<b>Figura 21-</b>	Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras supragengivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle).....	<b>91</b>
<b>Figura 22-</b>	Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras subgengivais/submucosas associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle) .....	<b>91</b>
<b>Figura 23-</b>	Curva de rarefação calculadas com base nos gêneros observados e nos dados de riqueza microbiana das comunidades de ambos os substratos investigados, titânio e zircônia.....	<b>93</b>
<b>Figura 24-</b>	Dendrograma de similaridade de comunidades obtido pelo coeficiente de correlação de Jaccard .....	<b>96</b>
<b>Figura 25-</b>	Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo de contagens de OTU ( $\times 105$ ) de patógenos periodontais detectados nos biofilmes supragengivais e submucosos de implantes locais (titânio e zircônia) ao longo do tempo.....	<b>97</b>
<b>Figura 26-</b>	Porcentagem de sequências “não classificadas” em amostras supra e subgengivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contra-laterais (controle).....	<b>98</b>
<b>Figura 27-</b>	Efeito relativo dos fatores substrato e tempo na profundidade de sondagem. T0: baseline; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.....	<b>101</b>
<b>Figura 28-</b>	Efeito relativo dos fatores substrato e tempo na recessão gengival. T0: <i>baseline</i> ; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.....	<b>102</b>
<b>Figura 29-</b>	Efeito relativo dos fatores substrato e tempo no sangramento à sondagem. T0: baseline; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.....	<b>103</b>



## *Lista de Tabelas*

---



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Bibliotecas construídas para a caracterização dos biofilmes pela técnica de sequenciamento genético. T1 = 1 ano após instalação da prótese.; T2 = 2 anos após instalação da prótese.; T3 = 3 anos após instalação da prótese. ....	<b>67</b>
<b>Tabela 2-</b>	Os valores de referência da curva controle, subtraídos do branco Curva controle para a quantificação dos DNAs amplificados .....	<b>73</b>
<b>Tabela 3-</b>	Distribuição da amostra por grupo, titânio ou zircônia, considerando gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, nos diferentes períodos investigados.....	<b>83</b>
<b>Tabela 4-</b>	Distribuição da amostra por grupo, titânio ou zircônia, considerando gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, nos diferentes períodos investigados.....	<b>83</b>
<b>Tabela 5-</b>	Valores da concentração e razão de absorbância (A260nm /A280nm) do DNA extraído das amostras em aparelho espectrofotômetro.....	<b>84</b>
<b>Tabela 6-</b>	Valores das leituras de fluorescência em aparelho espectrofluorímetro das bibliotecas ( <i>Pool</i> de amostras) de PCR dos genes 16S rRNA, proveniente dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle), e suas respectivas concentrações.....	<b>86</b>
<b>Tabela 7-</b>	Contagens de OTU e diferentes índices de diversidade de bactérias nas amostras de biofilme. T1 = 1 ano após instalação da prótese; T2 = 2 anos após instalação da prótese e T3 = 3 anos após instalação da prótese.....	<b>91</b>
<b>Tabela 8-</b>	Diferenças significativas entre os substratos de titânio e zircônia (ANOVA followed by Tukey's HSD).....	<b>93</b>
<b>Tabela 9-</b>	Média e desvio padrão ( $\pm$ DP) dos indicadores clínicos dos sítios periodontais e peri-implantares dos indivíduos reabilitados com conectores protéticos de zircônia ou titânio ao longo do tempo.....	<b>99</b>
<b>Tabela 10-</b>	Perda óssea marginal (mm, média $\pm$ DP) ao redor dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia após 12, 24 e 36 meses de função.....	<b>103</b>
<b>Tabela 11-</b>	Teste de correlação de Pearson entre parâmetros clínicos e diversidade microbiana.....	<b>104</b>



*Sumário*

---





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>45</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>59</b>
3.1 Delineamento experimental	59
3.2 Cálculo do tamanho da amostra	60
3.3 Seleção dos participantes	62
3.4 Procedimentos cirúrgicos e protéticos	62
3.5 Avaliação microbiológica	64
3.5.1 Coleta de amostras de biofilme	64
3.5.2. Sequenciamento do gene 16S rRNA-based PCR (Next Generation Sequencing)	66
3.5.2.1. Extração e Purificação do DNA genômico das amostras	66
3.5.2.2. Quantificação do DNA extraído	70
3.5.2.3. Amplificação do material genético extraído pela técnica do 16S rRNA-based PCR	70
3.5.2.4. Purificação dos Amplicons obtidos pela técnica do 16S rRNA-based PCR	70
3.5.2.5. Preparo das bibliotecas e amplificação por PCR em emulsão	72
3.5.2.6. Quantificação das bibliotecas por Fluorimetria	72
3.5.2.7. Quantificação das bibliotecas por PCR Real Time	73
3.5.2.8. Sequenciamento das bibliotecas	74
3.5.3. Determinação dos índices de diversidade alfa e beta	75
3.6 Avaliação dos parâmetros clínicos	75
3.7 Avaliação radiográfica	76
3.8 Análise dos dados	78
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>81</b>
4.1 População amostral	81
4.2 Resultados microbiológicos	84
4.2.1. Extração do DNA genômico das amostras	84
4.2.2. Avaliação da qualidade e integridade dos DNAs genômicos extraídos em gel de agarose 0,8%	85
4.2.3. Amplificação do material genético extraído pela técnica do 16S rRNA-based PCR	86
4.2.4. Avaliação da qualidade e integridade material genético obtido após amplificação do 16S rRNA em gel de agarose 0,8%	86
4.2.5. Diversidade Microbiana	88
4.2.6. Avaliação de patógenos periodontais	95

4.3 Indicadores clínicos.....	98
4.3.1. Profundidade de sondagem.....	98
4.3.2. Recessão gengival.....	100
4.3.3. Sangramento à sondagem.....	101
4.3.4. Perda óssea marginal.....	102
4.4 Parâmetros clínicos e correlação com achados microbiológicos.....	103
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>145</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>149</b>

*Introdução*

---



## 1. INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegráveis têm sido uma alternativa viável e amplamente utilizada na prática odontológica para a reabilitação protética de pacientes desdentados totais ou parciais (MUDDUGANGADHAR et al., 2015), pois oferece significativas vantagens biológicas e funcionais, quando comparados às próteses convencionais fixas ou removíveis (BUSER et al., 2017), e produzem excelentes resultados a longo prazo, conforme documentado por vários estudos que observaram uma taxa de sucesso e sobrevivência acima de 95% após acompanharem o desempenho dos implantes ao longo de 10 anos (FISCHER et al., 2012; GOTFREDSEN et al., 2012; BUSER et al., 2012; DEGIDI et al., 2012; POZZI et al., 2014; POZZI et al., 2021; ASSAF et al., 2022). A alta taxa de sucesso e não apenas de sobrevivência tem grande significado clínico, uma vez que sobrevivência se refere apenas ao implante estar em posição, independentemente da qualidade da restauração (VETROMILLA et al., 2018), e sucesso significa que o implante não resulta em dor, desconforto, infecção ou, mobilidade, é rodeado por osso estabilizado, apresenta ausência de complicações mecânicas e integração estética da restauração com os dentes adjacentes (ZARB et al., 1998; PAPASPYRIDAKOS et al., 2012).

Com base nas primeiras tentativas e no avanço de Brånemark, testemunhamos nos últimos 30 anos avanços significativos no desenvolvimento da implantodontia (BUSER et al., 2017). Ao longo dos anos, vários sistemas de implantes, conectores, designs e materiais de restaurações foram introduzidos com o objetivo de fornecer um tratamento funcional e estético mais eficaz (TOTOU et al., 2021). Os implantes dentários são uma parte indispensável da clínica odontológica. O setor financeiro ligado a implantodontia mundial está crescendo de forma constante e espera-se atingir cerca de US\$ 13,01 bilhões até o ano de 2023 (ALGHAMDI, 2020). Embora, a taxa de sobrevivência de implantes dentários ao longo de 10 anos tenha sido relatada superior a 95% (HOWE et al., 2019; ASSAF et al., 2022), isto constitui também um desafio para o futuro. Essa preocupação está relacionada com o envelhecimento da população, o número de idosos aumenta drasticamente no mundo todo (LAURITANO et al., 2019). A pirâmide etária brasileira passa por enorme transformação. Na maior parte do século passado a pirâmide tinha uma base larga e um topo muito estreito. Estima-se que mais de 40% da população brasileira tenha mais de 60 anos em 2100 (CÔRTE & LOPES, 2019).

Doenças bucais e comorbidades associadas ao envelhecimento resultam em uma maior necessidade de cuidados odontológicos preventivos, restauradores e periodontais (RAPHAEL,

2017; JANTO *et al.*, 2022). Os idosos são mais expostos a fatores que comprometem sua saúde física. Diabetes, osteoporose, obesidade e uso de medicações são condições que podem dificultar a regeneração óssea em torno dos implantes dentários (NAUJOKAT *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2018; ALGHAMDI *et al.*, 2020). Conseqüentemente, isso pode promover falha do implante e colocar em risco a atual taxa de sucesso (HOWE *et al.*, 2019). Além do envelhecimento da população, alguns fatores de risco podem reduzir o prognóstico favorável dos implantes dentários, levando à perda e/ou aumentando a ocorrência de complicações (SGOLASTRA *et al.*, 2015). Dentre as principais causas de falha tardia dos implantes estão a sobrecarga oclusal e a infecção microbiana (ALGHAMDI *et al.*, 2020). Uma revisão sistemática realizada por Naert e colaboradores (2012), com o objetivo de avaliar as consequências biológicas da sobrecarga oclusal nos implantes osseointegrados, observaram ausência de associação entre sobrecarga e perda óssea peri-implantar na ausência de inflamação, em contrapartida a sobrecarga oclusal em conjunto com a presença de biofilme oral levou a reabsorção óssea de forma significativa, o que enfatiza a importância do controle de biofilme oral para um melhor prognóstico na reabilitação com implantes.

A boca fornece não só uma porta de entrada para bactérias, mas também um ambiente para colonização bacteriana e crescimento (AAS *et al.*, 2005). Estima-se que a diversidade da microbiota oral conta com mais de 770 espécies diferentes, com pelo menos 100 espécies povoando a cavidade oral de um determinado indivíduo (MCCRACKEN; GARCIA, 2020). As bactérias presentes na cavidade oral raramente crescem de forma planctônica, elas naturalmente se organizam em comunidade, formando o biofilme (BELIBASAKIS *et al.*, 2015; DIAZ *et al.*, 2020). Os biofilmes apresentam um nível muito elevado de organização bacteriana estrutural e funcional, em que os constituintes bacterianos individuais comunicam-se por meio de processos moleculares (HUANG *et al.*, 2014) e demonstram características muito mais virulentas em comparação às bactérias em estado planctônico, uma vez que exibem padrões de expressão gênica alterados e são menos penetráveis por neutrófilos, anticorpos ou fatores antimicrobianos (SCHAUDINN *et al.*, 2009; DIAZ *et al.*, 2020).

Ao longo do tempo, as complexas relações entre o microbioma e o hospedeiro foram sendo parcialmente explicadas por diferentes hipóteses de desenvolvimento de doenças relacionadas aos biofilmes (MARSH *et al.*, 2011). Mudanças no microambiente local podem causar mudanças na composição do biofilme, dando margem a certas espécies bacterianas a crescer demais, aumentar sua virulência e eventualmente tornar-se patógenos oportunistas (DIAZ *et al.*, 2020). Essas espécies podem ser encontradas em baixos números na condição de saúde e podem se tornar patogênicos somente quando as condições recém estabelecidas os

permitir. Este é o principal impulso para a “teoria da placa ecológica”, essa teoria sugere que doenças mediadas por biofilme resultem de uma mudança na microbiota, de um estado de simbiose para um de disbiose (MARSH et al., 2017). Esse desequilíbrio microbiano não seria causado pelo efeito direto dos micro-organismos em si, mas sim por fortes pressões seletivas, que por sua vez, seriam promovidas por alterações ecológicas (MARSH, 2003; MARSH; DEVINE, 2011). Biofilmes disbióticos podem resistir a resposta do hospedeiro, causar processos inflamatórios e consequente destruição tecidual, como é o caso da perda óssea na peri-implantite (SOLBIATI; LOPEZ, 2018).

A infecção que resulta em um processo inflamatório nos tecidos peri-implantares continua a ser a principal limitação para o sucesso a longo prazo das restaurações suportadas por implantes na odontologia (BUSER et al., 2017). A falha do implante ocorre com frequência como resultado de contaminação microbiana não controlada (SGOLASTRA et al., 2015; CARRASCO-GARCÍA et al., 2019). As superfícies dos implantes, componentes relacionados ao implante e próteses implantossuportadas são prontamente colonizados por micro-organismos após a exposição oral (QUIRYNEN et al., 2006; QUIRYNEN et al., 2011). De forma semelhante ao dente, após exposto na cavidade oral, o implante dentário é coberto por uma camada de película adquirida, ou seja, um extrato orgânico constituído principalmente por fosfoproteínas, glicoproteínas e lipídios (MARSH et al., 2016; LARSEN; FIEHN, 2017). Essa película fornece receptores para as adesinas de bactérias específicas, o que permite a agregação bacteriana e desencadeia a formação do biofilme inicial (HOJO et al., 2009).

Os implantes dentários são mais suscetíveis à invasão de patógenos, pois as fibras de colágeno peri-implantares são dispostas em paralelo e apresentam uma união mais fraca que as fibras ao redor dos dentes naturais (BELIBASAKIS et al., 2015). Além disso, devido ao suprimento sanguíneo reduzido, a resposta do hospedeiro e a migração de células imunes é mais restrita (BERGLUNDH et al., 2011). Esses fatores levam a uma destruição tecidual mais rápida e mais extensa (SALVI et al., 2017). Diante disso, definir o perfil microbiológico associado às condições infecciosas e de saúde peri-implantar é um passo crucial na obtenção de protocolos de tratamento mais eficazes (PÉREZ-CHAPARRO et al., 2016).

Diversas revisões sistemáticas se propuseram a investigar diferenças ou semelhanças no perfil microbiano da peri-implantite em relação aos dentes com doença periodontal ou implantes saudáveis (LAFURIE et al., 2016; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2017; DUARTE et al., 2016; FAOT et al., 2015; RAKIC et al., 2016; KENSARA et al., 2021), mas não há um consenso na literatura que reforce a existência de diferenças específicas entre a microbiota de dentes saudáveis e implantes saudáveis, ou de dentes com periodontite e implantes com peri-

implantite (RETAMAL-VALDES et al., 2019). Alguns autores observaram grande semelhança no perfil microbiano de implantes saudáveis com os dentes vizinhos, de forma que estes atuam como “reservatórios” para os biofilmes que se acumulam ao redor dos implantes (BOTERO et al. 2005; SALVI et al. 2008). Dentes com periodontite, implantes saudáveis ou implantes com peri-implantite são colonizados por micro-organismos periodontais (LAFURIE et al., 2017), porém a peri-implantite parece estar associada a uma microbiota complexa e diferente dos implantes saudáveis, essa diferença gera maior resposta inflamatória e perda óssea (KENSARA et al., 2021).

Os autores sugerem a associação de alguns micro-organismos com a etiologia da peri-implantite, incluindo bactérias Gram-negativas anaeróbicas obrigatórias, como *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* e Gram-positivos anaeróbios assacarolíticos, como *Eubacterium* e outras espécies bacterianas, como *Campylobacter rectus*, *Dialister invisus*, *Parvimonas micra*, e *Staphylococcus epidermidis* (FAOT et al., 2015; LAFURIE et al., 2016; DUARTE et al., 2016; RAKIC et al., 2016; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2017; KENSARA et al., 2021). Alguns estudos sugerem ainda uma possível associação entre a peri-implantite e o vírus Epstein-Barr e o citomegalovírus humano (JANKOVIC et al., 2011; JANKOVIC et al., 2011b; VERDUGO et al., 2015; KATO et al., 2017; CANULLO et al., 2018), o que pode potencializar o efeito bacteriano nos tecidos peri-implantares, porém uma meta-análise publicada recentemente não encontrou essa associação, mas ressalta que há poucos estudos e sugere que mais pesquisas sobre esse tema sejam realizadas (ROCA-MILLAN et al., 2021).

Apesar de abranger uma grande variedade de espécies bacterianas, a colonização na película adquirida segue um padrão, com a adesão de colonizadores iniciais seguida de colonização secundária através da adesão interbacteriana ou co-adesão (FURST et al., 2007). Os primeiros colonizadores são espécies do gênero *Streptococcus* e *Actinomyces* (ABRANCHES et al. 2018). O biofilme inicial parece ser bastante influenciado pelos dentes remanescentes no caso de indivíduos parcialmente desdentados (GERBER et al., 2006). Os indivíduos totalmente desdentados também apresentam uma colonização inicial do biofilme semelhante à presente antes da perda do dente (SACHDEO et al., 2008). Os estreptococos constituem até 80% das bactérias do biofilme inicial (DIAZ et al., 2019). Essas espécies criam pré-condições para a acúmulo de bactérias de colonização tardia, como espécies de *Fusobacterium* e *Prevotella* (HANNIG 1997; AAS et al. 2005). Espécies de *Fusobacterium* desempenham importante função na formação do biofilme oral maduro, uma vez que estas bactérias se agregam tanto à colonizadores iniciais (predominantemente Gram-positivos),



quanto a colonizadores tardios (bactérias Gram-negativas, incluindo espécies periodontopatogênicas) (LARSEN; FIEHN, 2017).

Embora existam fatores relacionados ao paciente que contribuem para o estabelecimento e progressão das doenças peri-implantares, o biofilme continua sendo o principal fator etiológico e que pode ser controlado através do desenvolvimento de materiais com propriedades otimizadas (TEUGHELIS et al., 2006; BRUM et al., 2021). As propriedades físicas e químicas da superfície dos materiais afetam os processos de adesão bacteriana (BRUM et al., 2021). Compreender essas características é fundamental para o desenvolvimento de novas superfícies otimizadas com capacidades antibacterianas e anti-inflamatórias, o que pode ser útil na prevenção de doenças peri-implantares (OH et al., 2018; LI et al., 2019). A fixação bacteriana e a adesão às diferentes superfícies parecem ser influenciadas por vários fatores, incluindo topografia de superfície, molhabilidade, composição química, hidrofobicidade, energia de superfície, rugosidade e textura (REFAI et al., 2004; BARBOUR et al., 2007; OH et al., 2018; MOUHAT et al., 2020).

As interações moleculares resultam da energia livre de superfície e diferenças na polaridade bacteriana, favorecendo ou dificultando a colonização superficial (TEUGHELIS et al., 2006; DE AVILA et al., 2016; ENGEL et al., 2020). Portanto, diferentes materiais empregados para a fabricação de componentes de implante podem influenciar na adesão microbiana e na formação de biofilme no implante dentário (AL-RADHA et al., 2012; HAHNEL et al., 2015). A interface implante-conector nos sistemas de implante de duas peças são particularmente propensos à formação de biofilme e proliferação de micro-organismos (DO NASCIMENTO et al., 2014). Os microgaps entre o implante e o conector podem abrigar espécies bacterianas e permitem a proliferação bidirecional de micro-organismos, fluidos e toxinas através da interface. Este processo pode levar a respostas inflamatórias nos tecidos moles peri-implantar, reabsorção óssea e, em última instância, falha do implante (SCHWARZ et al., 2014; CERUSO et al., 2017).

O conector protético ou *abutment* normalmente se refere a estrutura intermediária entre o implante e a restauração, responsável por fornecer suporte e retenção à prótese (BUSER et al., 2017). Alguns estudos mostram que o conector também pode afetar os tecidos moles e duros ao redor do implante (MOLINA et al., 2016; TOTOU et al., 2021). Atualmente, vários materiais de conectores protéticos estão disponíveis, entre os quais, os de titânio e zircônia são os mais comumente usados na prática clínica (LOPS et al., 2016). Desde a década de 1960, o titânio comercialmente puro e algumas de suas ligas são os materiais mais empregados e estudados. Sendo amplamente utilizado como implantes dentários e conectores devido à sua

biocompatibilidade, resistência mecânica e propriedades de resistência à corrosão (BUSER et al., 2017). No entanto, os conectores metálicos muitas vezes resultam em uma descoloração acinzentada da mucosa peri-implantar, especialmente em tecidos moles de biótipos finos (TOTOU et al., 2021).

Recentemente, a zircônia foi introduzida como um material alternativo devido às suas melhores propriedades estéticas, excelente resistência à corrosão, biocompatibilidade e alta resistência ao desgaste (LINKEVICIUS et al., 2015). Revisões sistemáticas comparando conectores cerâmicos e metálicos não mostraram diferença significativa nas taxas de sobrevivência ou complicações técnicas (SAILER et al., 2009; ZEMBIC et al., 2014; PJETURSSON et al., 2018; HU et al., 2019). A zircônia parece ter um melhor efeito na manutenção do nível ósseo marginal, em comparação com os conectores de titânio, alumina e ouro (LIU et al., 2015; HU et al., 2019). Em relação ao desempenho mecânico, os conectores de zircônia parecem apresentar uma resistência à fratura inferior aos de titânio (LEUTERT et al., 2012; FOONG et al., 2013; PJETURSSON et al., 2018), embora ainda não exista um consenso na literatura quanto a isso (CORAY et al., 2016; NAVEAU et al., 2019).

A principal indicação dos conectores de zircônia é para reabilitação em regiões anteriores, onde a exigência estética é maior (TOTOU et al., 2021), mas alguns estudos clínicos randomizados com até 5 anos de acompanhamento mostraram resultados mecânicos e biológicos semelhantes entre os conectores de titânio e zircônia em regiões de canino ou posteriores (SAILER et al., 2009; HOSSEINI et al., 2013; ZEMBIC et al., 2013). No entanto, uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Vechiato-Filho e colaboradores (2016), após avaliarem se a taxa de sobrevivência e previsibilidade dos conectores de zircônia são semelhantes aos de titânio para coroas unitárias em região posterior, concluíram que apesar dos resultados a curto prazo sejam bastante promissores, o uso de conectores de zircônia em regiões posteriores é questionável devido à ausência de dados a longo prazo, sendo necessário cautela ao usar conectores de zircônia em regiões posteriores até que mais evidências clínicas mostrem resultados favoráveis a longo prazo.

Estudos clínicos randomizados observaram resultados clínicos, biológicos e técnicos semelhantes entre conectores protéticos de zircônia associados à prótese cimentada ou parafusada (AMORFINI et al., 2018; HEIERLE et al., 2019; KRAUS et al., 2019). Uma revisão sistemática recente realizada por Naveau e colaboradores (2019) avaliaram o desempenho estético e mecânico dos conectores de zircônia pré-fabricados e personalizados nos últimos 5 anos. Os autores não observaram diferenças em relação à estética, fratura ou afrouxamento de parafuso em estudos de até 12 anos de acompanhamento, além disso, para evitar possíveis

fraturas, indicam o uso de conectores pré-fabricados com inclinação de até 20° e para os personalizados de até 30°.

Linkevicius e colaboradores (2015) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise com o objetivo de analisar o efeito dos conectores de zircônia ou titânio nos tecidos moles peri-implantares. Os autores observaram que a zircônia é um material mais favorável aos tecidos moles por fatores estéticos, pois proporcionam uma melhor combinação de cores entre os tecidos moles peri-implantares. Resultado semelhante observado em outras revisões sistemáticas e meta-análises reforçam essa vantagem dos conectores de zircônia aos de titânio (CAI et al., 2018; HU et al., 2019; PITTA et al., 2020; TOTOU et al., 2021). No entanto, essa diferença parece ser apreciada apenas no biótipo de tecido mole fino, uma vez que se a espessura do tecido for superior a 2 mm, o olho humano não pode detectar as diferenças entre os materiais (LOPS et al., 2016). Esses achados apoiam a preferência por conectores de zircônia em casos esteticamente exigentes.

A adesão dos tecidos moles aos conectores protéticos também é um critério importante para o prognóstico favorável dos implantes, pois funciona como uma barreira biológica que evita a passagem de bactérias entre o epitélio juncional em direção subgengival, o que poderia favorecer o desenvolvimento de peri-implantite (TETE et al., 2009; HANAWA et al., 2020). Alguns estudos observaram que a zircônia parece apresentar melhores propriedades biológicas com os tecidos peri-implantares em comparação ao titânio, pois modulam as fibras colágenas, a fixação e o comportamento das células epiteliais com maior eficácia e biocompatibilidade (NOTHDURFT et al. 2014; CRUZ et al., 2020; KUNRATH et al., 2021).

Outra possível vantagem dos conectores de zircônia é a menor adesão de micro-organismos (HANAWA et al., 2020). Vários estudos *in vivo* observaram menor suscetibilidade à colonização precoce de biofilme em conectores de zircônia comparados ao titânio (RIMONDINI et al., 2002; SCARANO et al., 2004; AL-AHMAD et al., 2010; YAMANE et al., 2013; DO NASCIMENTO et al., 2016; RAFFAINI et al., 2018; CLEVER et al., 2018) ou ainda ausência de diferença entre os materiais (BOLLEN et al., 1996; AL-AHMAD et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2014; AL-AHMAD et al., 2016; SALIHOGLU et al., 2011; VAN BRAKEL et al., 2011; DE FREITAS et al., 2018). Estudo *in vitro* observaram resultados semelhantes (ABDELHAMED et al., 2015; SANCHEZ et al., 2017; BLACK et al., 2017; ROEHLING et al., 2017; ESFAHANIZADEH et al., 2018). Uma meta-análise publicada recentemente por Kniha e colaboradores (2021) investigaram os efeitos dos conectores ou implantes de zircônia e titânio na formação de biofilme oral. Além de características dos materiais, os pesquisadores investigaram parâmetros como espessura do biofilme, distribuição,

contagem e adesão bacteriana. Devido a heterogeneidade dos estudos, os dados obtidos não permitiram obter uma preferência clara entre a zircônia ou titânio, e sugeriram que mais estudos comparáveis fossem realizados.

A adesão microbiana nas superfícies dos conectores de implantes pode ter um impacto no processo de cicatrização, sucesso em longo prazo da osseointegração, bem como na potencial falha do implante (RIMONDI et al., 2002; SCARANO et al., 2004). Uma meta-análise realizada por Lee e colaboradores (2017) observaram que 20% dos indivíduos tratados com implantes dentários apresentam peri-implantite. No caso de pacientes parcialmente edêntulos afetados pela doença periodontal, o tipo ideal de conector protético utilizado deve ser aquele que adere a mínima quantidade de bactérias periodontopatogênicas (DE AVILA et al., 2014). Portanto, é de relevância clínica conhecer como as bactérias se comportam em diferentes tipos de substratos para desenvolver novos materiais e/ou novos tipos de superfícies de tratamento, que irão reduzir ou inibir a adesão de micro-organismos patogênicos e, assim, minimizar a falha do tratamento por peri-implantite.

As diferenças observadas no perfil microbiano relacionado aos conectores de zircônia e titânio, demonstrados em investigações clínicas e laboratoriais (DO NASCIMENTO et al., 2016; SILVA et al., 2020), sugerem que o impacto do substrato nas comunidades microbianas pode ser específico, e que muda com o tempo durante o carregamento funcional. Comunidades microbianas são inerentemente dinâmicas e, como tal, requerem dados longitudinais de indivíduos. Uma vez que a incidência de peri-implantite aumenta com o tempo após a colocação do implante (DREYER et al., 2018) é fundamental estabelecer como o perfil microbiano inicial pode refletir na colonização a longo prazo das superfícies implantadas. Compreender a influência em longo prazo dos conectores protéticos na formação de biofilme, e como eles se correlacionam com os parâmetros clínicos são de grande importância para verificar a confiabilidade dos conectores de zircônia. Portanto, estudos que correlacionam o período de carregamento funcional e tipo de substrato do conector com parâmetros clínicos e microbiológicos são muito relevantes, assumindo que diferenças na estrutura dos substratos suportam diferentes comunidades. Além disso, poucos estudos utilizaram o sequenciamento do rRNA 16S para esse fim.

*Proposição*

---



## 2. PROPOSIÇÃO

### *Objetivo geral*

O objetivo desse estudo foi investigar as comunidades microbianas presentes no biofilme formado sobre conectores de titânio ou zircônia em restaurações unitárias implantossuportadas e correlacioná-las com os achados clínicos após 3 anos de função mastigatória.

### *Objetivos específicos*

- ✓ Comparar os indicadores clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, recessão gengival e reabsorção óssea marginal em implantes unitários restaurados com conectores protéticos de titânio ou zircônia, nos períodos T1 = 1 ano, T2 = 2 anos e T3 = 3 anos após a instalação da prótese.
- ✓ Comparar, por meio do sequenciamento do gene 16S-rRNA bacteriano, as espécies microbianas colonizando o biofilme supra e submucoso formado sobre as restaurações com conectores de titânio ou zircônia, desde a sua instalação até o período de 3 anos de função mastigatória.
- ✓ Relacionar os indicadores clínicos investigados com os resultados microbiológicos durante os períodos propostos.

### *Hipóteses Testadas*

- (1) Riqueza de espécies, diversidade de suas comunidades e o número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) dependem do tipo de substrato do conector.
- (2) O tempo de carga funcional afeta a comunidade microbiana.
- (3) Parâmetros clínicos de restaurações de implantes são correlacionados com achados microbianos.





## *Material e Métodos*

---



### 3. MATEIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Delineamento experimental

Esta pesquisa consistiu em um estudo clínico longitudinal prospectivo, onde foi investigado a influência do material utilizado na confecção do conector protético, titânio ou zircônia, na adesão e colonização do biofilme oral formado sobre restaurações protéticas e tecidos de suporte ao redor do implante, além do impacto, em longo prazo, na saúde dos tecidos peri-implantares. O estudo foi realizado nas Clínicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, SP - Brasil, pertencente à Universidade de São Paulo. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Ensaios Clínicos local sob o processo CAAE 0066.0.138.000-10 (Anexo A) e todos os experimentos foram realizados com o consentimento informado e por escrito dos participantes (Apêndice). O estudo foi desenvolvido de acordo com as declarações CONSORT para relatórios de ensaios clínicos.

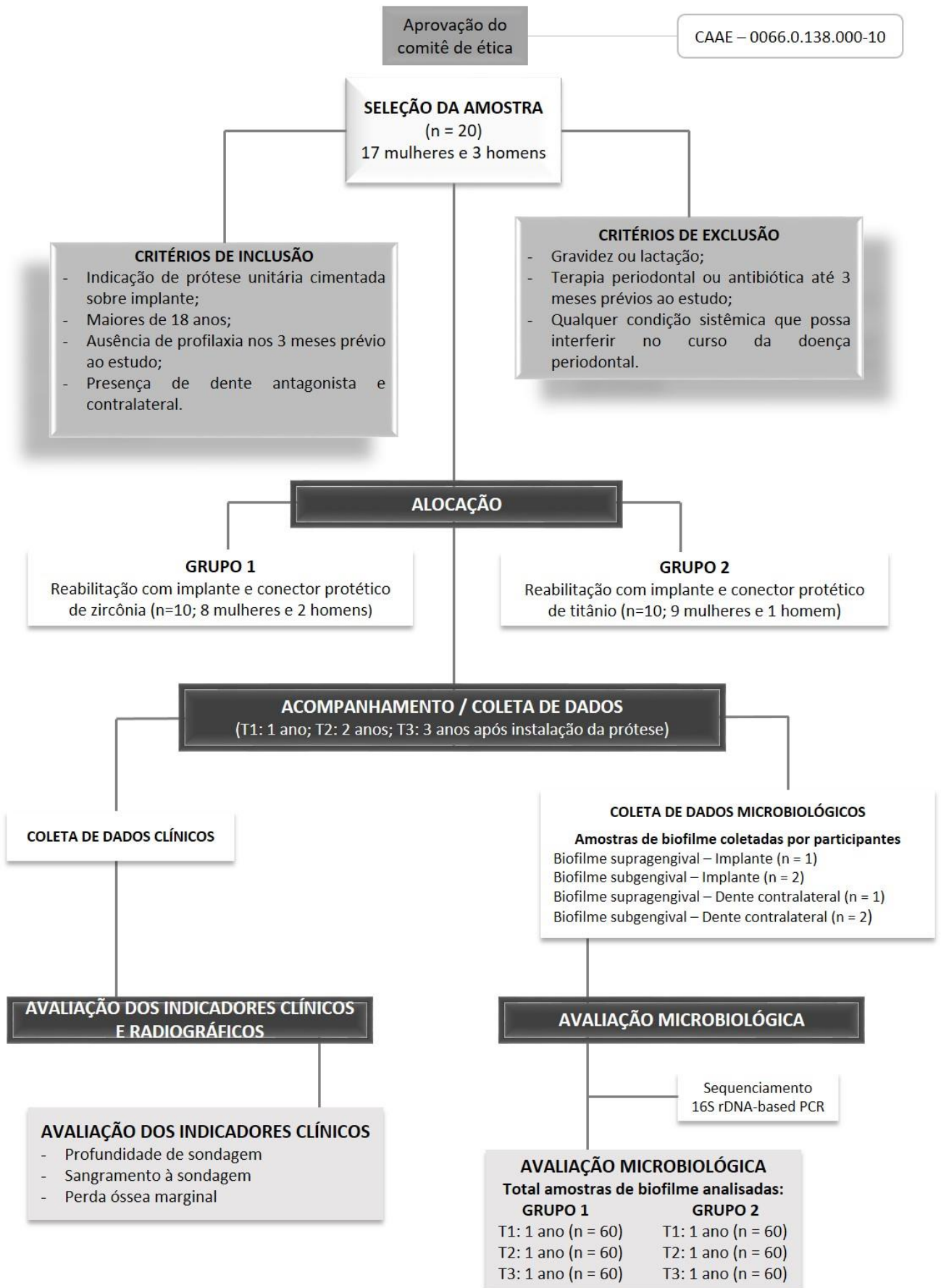
Este trabalho constitui a segunda fase de um estudo inicial no qual os objetivos propostos foram avaliar o perfil microbiológico e o comportamento clínico de implantes restaurados com conectores protéticos de titânio ou zircônia desde a instalação da prótese até o período de 6 meses de função. Para esta segunda fase do estudo, foram recrutados todos os 20 participantes (17 mulheres e três homens; idade média de 45,5 anos; faixa de 18 a 69 anos) previamente reabilitados com implantes dentários e coroas protéticas unitárias cimentadas sobre conectores de titânio (Grupo 1; n = 10) ou zircônia (Grupo 2; n = 10). Os participantes do Grupo 1 (oito mulheres e dois homens, idade média de 47 anos) foi constituído por indivíduos que receberam um implante dentário de duas partes com uma conexão cone Morse (Ankylos C/X, Dentsply) na área anterior da maxila e posteriormente restaurados com conectores estéticos de zircônia pré-usinados (Ankylos Cercon Balance, Dentsply) e o Grupo 2 (nove mulheres e um homem, idade média 48 anos) compreendeu indivíduos que receberam os mesmos implantes em a região posterior da maxila / mandíbula e foram restaurados com conectores de titânio pré-usinados (Ankylos Regular Abutment C/X, Dentsply). Todos os implantes tinham diâmetro de 3,5 mm e comprimento variando de 8 a 17 mm dependendo das condições anatômicas. Para rastrear alterações na microbiota oral, durante o estudo, que teve duração de três anos, foram realizadas coletas de biofilme oral aderido à coroa protética (supragengival) e presente no sulco peri-implantar (submucoso), nos períodos T1 = 12 meses, T2 = 24 meses e T3 = 36 meses após instalação da prótese. Essas amostras foram usadas para explorar a dinâmica da comunidade microbiana e descrever a diversidade geral dos sítios associados aos conectores investigados. Esta avaliação foi realizada por meio do

sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano. Também, nos períodos de acompanhamento, foram coletados dados que permitissem avaliar o desempenho clínico dessas restaurações, como profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, e perda óssea marginal. Adicionalmente, foram coletados os dados dos indicadores clínicos e amostras de biofilme supra e subgingival dos dentes contralaterais, que foram usados como controle intra-indivíduo das variáveis testadas. Rechamadas anuais para o programa de manutenção de higiene de apoio e exames foram realizadas durante o estudo. O delineamento experimental do estudo e o fluxo das amostras de biofilme analisadas de todos os participantes incluídos está ilustrado na Figura 1.

### 3.2. Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra ( $n=20$ ) foi calculado com o auxílio do software PASS 2005 (NCSS, Kaysville, EUA). Foi selecionado o parâmetro contagem microbiana como variável primária para a determinação do “n” amostral. Para a comparação de dois grupos independentes (titânio e zircônia) com medidas repetidas realizadas em diferentes tempos foram considerados um desvio-padrão de 1,26 entre indivíduos e 0,89 nas medidas intra-indivíduo, estes valores foram obtidos com base em dados presentes na literatura e a partir de estudos pilotos. O poder estatístico (*power*) foi de 84% para o fator grupo e 96% para o fator tempo e interação grupo x tempo, com nível de significância igual a 5% e magnitude do efeito (*effect size*) de 0,79 para o fator grupo e 1,12 para o fator tempo e interação grupo x tempo. Com base nesses critérios, o tamanho da amostra obtido foi de 8 participantes para cada grupo; e para compensar possíveis perdas de seguimento, foi acrescentado 20% no valor da amostra, totalizando 10 participantes por grupo e 20 participantes no total.

Figura 1. Fluxograma do estudo.



### 3.3. Seleção dos participantes

Para este estudo, foram recrutados os 20 participantes que participaram da primeira fase do estudo. Os critérios de inclusão foram: idade acima de 18 anos; ausência de profilaxia nos 3 meses prévios ao início do estudo; boas condições de saúde geral; indicação de reabilitação com implante na região anterior de maxila ou posterior de maxila/mandíbula e instalação de prótese unitária cimentada sobre implante; presença de dente antagonista e contralateral ao sítio do implante; ausência de manifestações bucais de doenças sistêmicas ou processos infecciosos agudos na cavidade oral. Os critérios de exclusão utilizados foram: gravidez, lactação, tratamento periodontal ou antibiótico nos últimos 3 meses, presença de qualquer condição sistêmica que pudesse influenciar o curso da doença periodontal ou que exigisse pré-medicação para procedimentos, fumantes e pacientes com gengivite ou periodontite. Foram dadas orientações quanto aos procedimentos da pesquisa, e aos voluntários foi novamente facultado o direito de decidir sobre sua participação ou não nesta segunda fase do estudo.

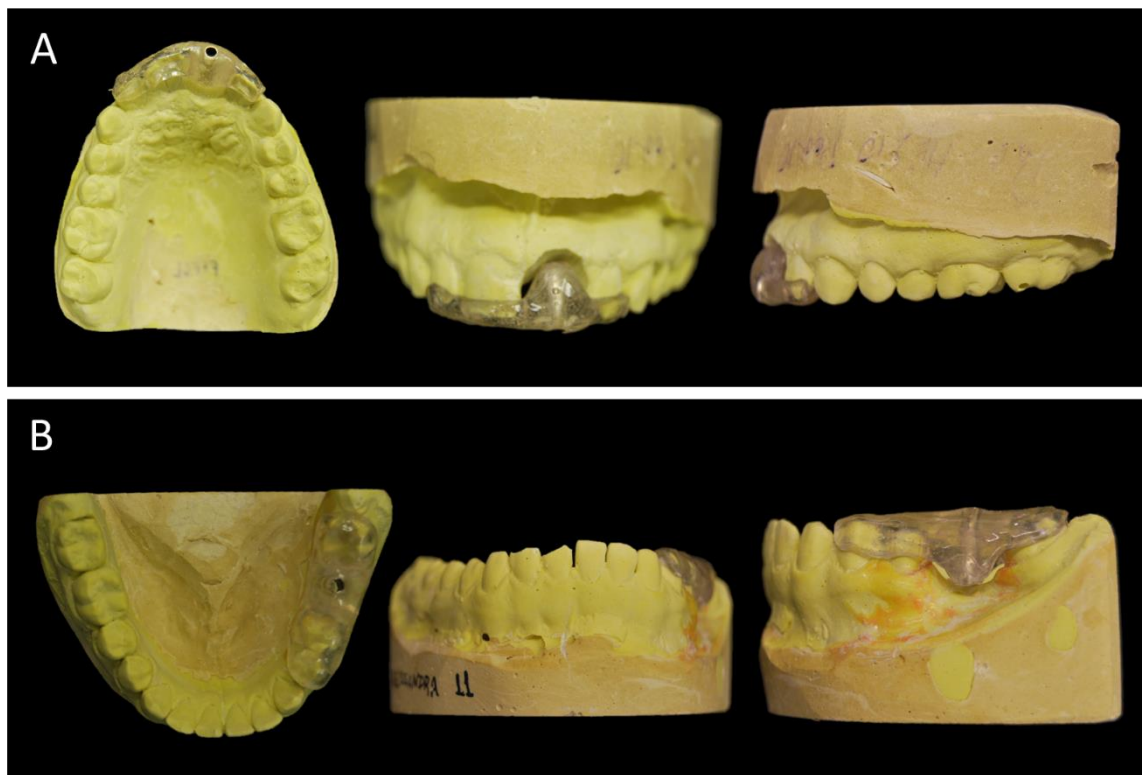
### 3.4. Procedimentos cirúrgico e protético

Todos os participantes recrutados foram reabilitados na primeira etapa do estudo, pelo mesmo clínico experiente, com implantes de conexão do tipo cone morse com plataforma de diâmetro 3,5 mm e comprimento variando de 8 a 17 mm dependendo das condições anatômicas (Ankylos C/X, Dentsply Friadent). Os participantes do grupo 1 (n = 10) receberam os implantes na região anterior da maxila; neste grupo, as restaurações protéticas foram cimentadas sobre os conectores protéticos de zircônia (Cercon Balance C/ reto, Ankylos). Os outros 10 indivíduos (Grupo 2) receberam os implantes na região posterior da maxila ou mandíbula, e as restaurações foram cimentadas sobre conectores protéticos de titânio (Balance posterior C/ reto, Ankylos). Em ambos os grupos, os implantes foram colocados ao nível da crista óssea alveolar, em sítios cirúrgicos sem enxerto, com realização de retalho e utilização de guia cirúrgico (Figura 2), seguido pela inserção de conectores de cicatrização transmucoso. Os conectores de cicatrização tinham comprimentos diferentes de modo que a superfície oclusal terminasse 1,0 mm acima da margem gengival. Nenhuma complicação cirúrgica ou pós-cirúrgica foi observada e todos os implantes apresentaram estabilidade primária satisfatória após sua inserção.

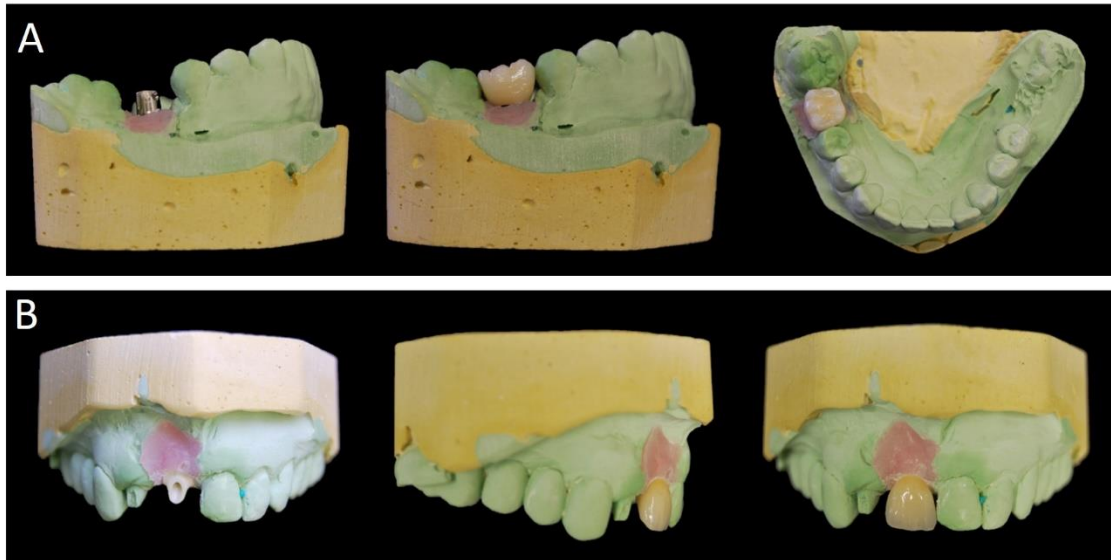
O tratamento protético foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e as restaurações finais foram entregues após 75 dias ( $\pm$  5 dias) da colocação do implante. Os conectores de titânio foram restaurados com coroas metalocerâmicas (liga de cobalto-cromo folheada com porcelana feldspática) enquanto os conectores de zircônia foram restaurados com

coroas totalmente de cerâmica (CAD-CAM Lava Frame cerâmica e Lava Ceram folheada cerâmica, 3M ESPE) (Figura 3). A cimentação definitiva foi realizada com cimento de fosfato de zinco (SS White) para restaurações metalocerâmicas e cimento autoadesivo RelyX Unicem (3M ESPE) para coroas totais de cerâmica. Todos os conectores utilizados eram usinados de fábrica, e não sofreram qualquer tipo de tratamento ou acabamento superficial.

**Figura 2** - Guias cirúrgicos confeccionados para auxílio no posicionamento correto dos implantes. A: Guia cirúrgico representativo para instalação de implante na região anterior de maxila (Grupo 1 - Zircônia); B: Guia cirúrgico representativo para instalação de implante na região posterior de mandíbula (Grupo 2 - Titânio).



**Figura 3.** Restaurações protéticas utilizadas na restauração dos conectores de titânio (Grupo 1) ou zircônia (Grupo 2). A: Coroas metalocerâmicas (liga de cobalto-cromo folheada com porcelana feldspática) utilizadas no grupo 1. Coroas totalmente de cerâmica (CAD-CAM Lava Frame cerâmica e Lava Ceram folheada cerâmica, 3M ESPE) utilizadas no grupo 2.



### 3.5. Avaliação microbiológica

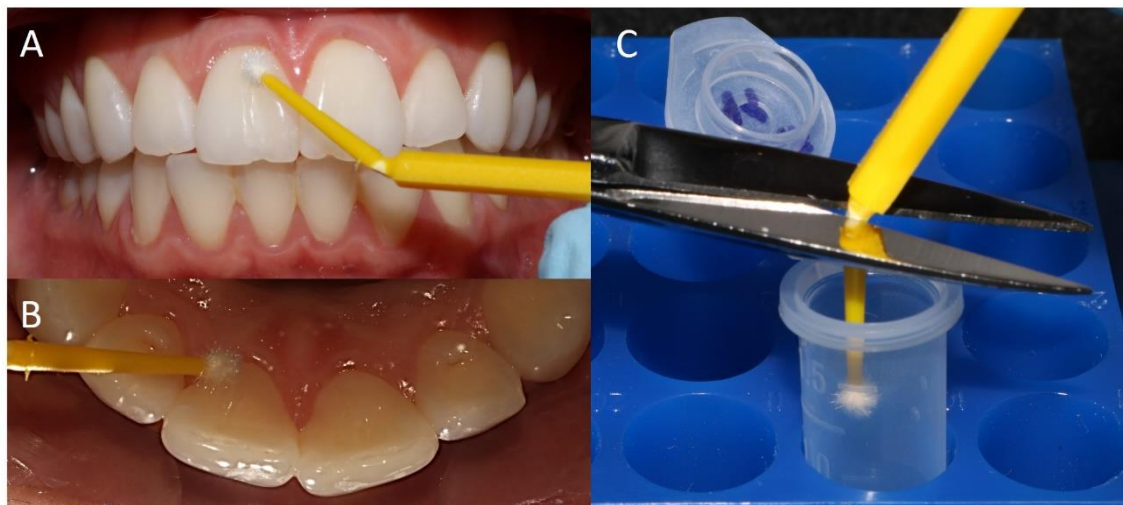
#### 3.5.1. Coleta das amostras de biofilme

As amostras de biofilme supragengival e subgengival/submucoso de implantes-restaurações e seus respectivos dentes contralaterais foram coletadas após três tempos distintos, T1= 12 meses, T2= 24 meses e T3= 36 meses dos implantes em função na cavidade oral. Todos os instrumentais e materiais utilizados para a coleta das amostras foram previamente e posteriormente esterilizados em autoclave. Os implantes e dentes contralaterais foram previamente isolados com roletes de algodão, a fim de minimizar o risco de contaminação das amostras com a saliva. As amostras do biofilme supragengival foram coletadas primeiro por meio da fricção de uma escova do tipo *microbrush* (esférico / tamanho regular) na superfície externa das coroas protéticas e dentárias (Figuras 4A e 4B). Em seguida, foram coletadas as amostras do biofilme submucoso dos sulcos peri-implantares com o auxílio de cones de papel (tamanho 30, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Foram coletadas (duas vezes) 6 amostras de cada elemento, 3 no sulco vestibular e 3 no sulco lingual/palatino (região mesial, central e distal) (Figuras 5A e 5B). Os cones permaneceram introduzidos nos sulcos por 30 segundos e, ao final da coleta, foram inseridos em microtubos individuais e identificados contendo 150  $\mu$ L de solução tampão Tris-HCl (10mM; pH 7,6), conforme ilustra a Figura 5C. Amostras dos

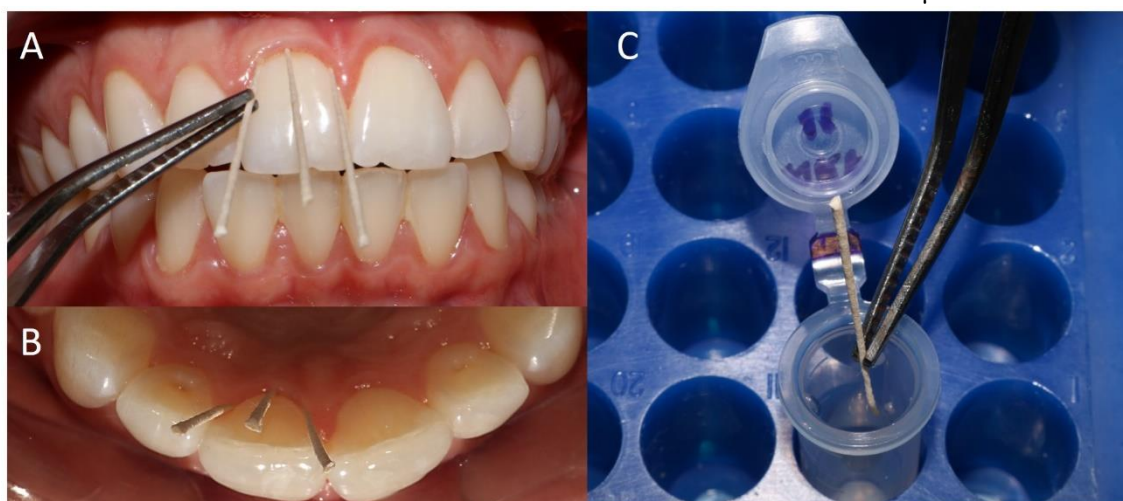


sulcos periodontais contralaterais também foram coletadas seguindo o mesmo protocolo. Ao todo, entre amostras dos implantes e dentes contralaterais, foram coletadas 360 amostras de biofilme. Todos os microtubos serão armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento das amostras.

**Figura 4.** Imagem representativa da coleta do biofilme supra gengival na superfície externa das coroas protéticas e dentárias, com o auxílio de uma escova do tipo *microbrush* e armazenada em microtubo. A: coleta na região vestibular; B: coleta na região palatina; C: armazenamento da amostra em tubo individual contendo 150  $\mu\text{L}$  de TE.



**Figura 5.** Imagem representativa da coleta do biofilme submucoso na superfície externa das coroas protéticas e dentárias, com o auxílio de cones de papel esterilizados e armazenados em microtubo. A: coletas no sulco vestibular (regiões central, mesial e distal); B: coletas no sulco palatino (regiões central, mesial e distal); C: cones contendo o biofilme sendo armazenados em um mesmo tubo individual contendo 150  $\mu\text{L}$  de TE.



### 3.5.2. Sequenciamento do gene 16S rDNA-based PCR (Next Generation Sequencing)

O processamento das amostras pelo sequenciamento do gene 16S foi realizada parte em nosso Laboratório, e parte no Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, uma *facility* recentemente estabelecida na FCFRP-USP com recursos FAPESP e da USP e que oferece diversos serviços de sequenciamento de nova geração.

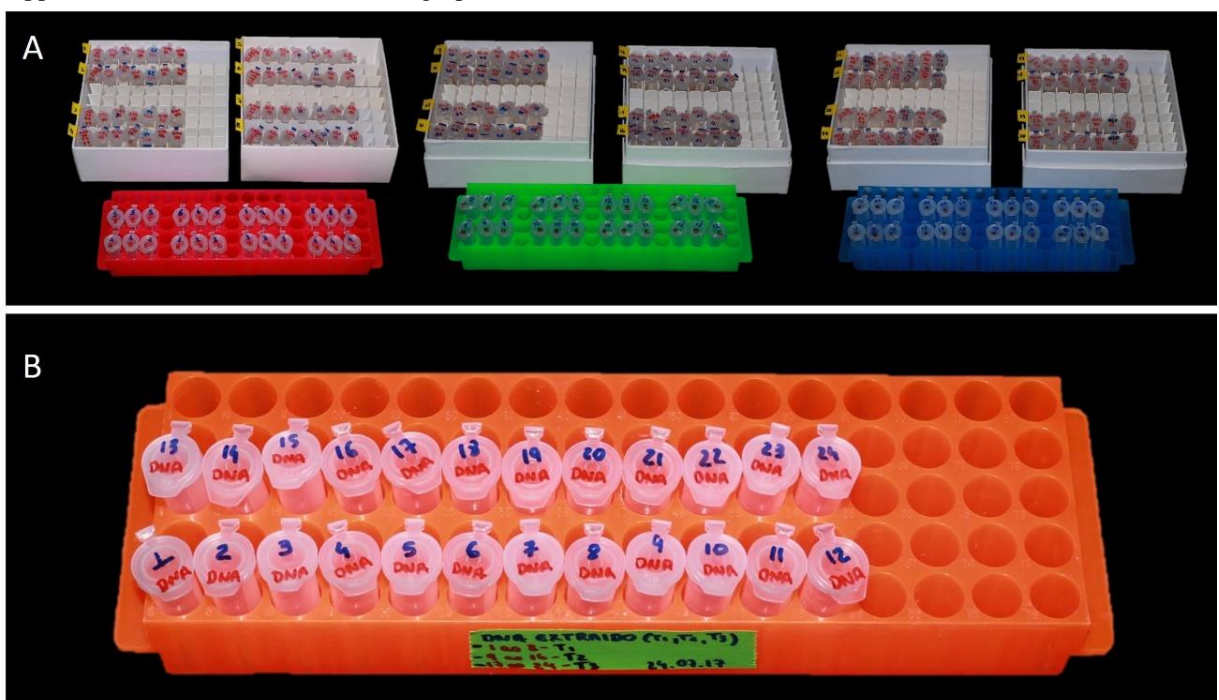
#### 3.5.2.1. *Extração e Purificação do DNA genômico das amostras*

O DNA foi isolado por meio da utilização do tampão de extração utilizando CTAB (1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB), clorofórmio:álcool isoamílico CIA (24:1), isopropanol e etanol. Previamente à extração do material genético, os microtubos individuais, contendo as amostras de biofilme supragengival ou subgengival/submucoso dos implantes-restaurações e dentes contralaterais, foram homogeneizadas em um agitador de tubos durante 10 segundos. A seguir, as 360 amostras foram divididas em 24 bibliotecas, de acordo com o sítio de coleta (Tabela 1; Figura 6A), e toda a solução tampão correspondente a cada biblioteca foi homogeneizada e transferida para um único microtubo para ser iniciado a técnica de extração (Figura 6B). Os microtubos contendo as amostras foram centrifugados a 13200 rpm durante 7 minutos para precipitar as células e remover o conteúdo sobrenadante (Figura 7A). Em seguida foi adicionado 700 µL do tampão CTAB de extração com proteinase K (100mg/mL) e incubação em 65°C durante 30 minutos (Figura 7B). Após o período de incubação, foram adicionados 650 µL de CIA (24:1) em cada microtubo, homogeneizados lentamente e centrifugados a 13200 rpm por 7 minutos para formação de duas fases (Figura 8A). A fase aquosa de cada microtubo foi removida cuidadosamente (Figura 8B) e transferida para um tubo novo com a adição de 250 µL do tampão de extração sem proteinase K, 650 µL de CIA e centrifugação a 13200 rpm por 7 minutos. O mesmo procedimento é repetido por duas vezes sem o tampão de extração.

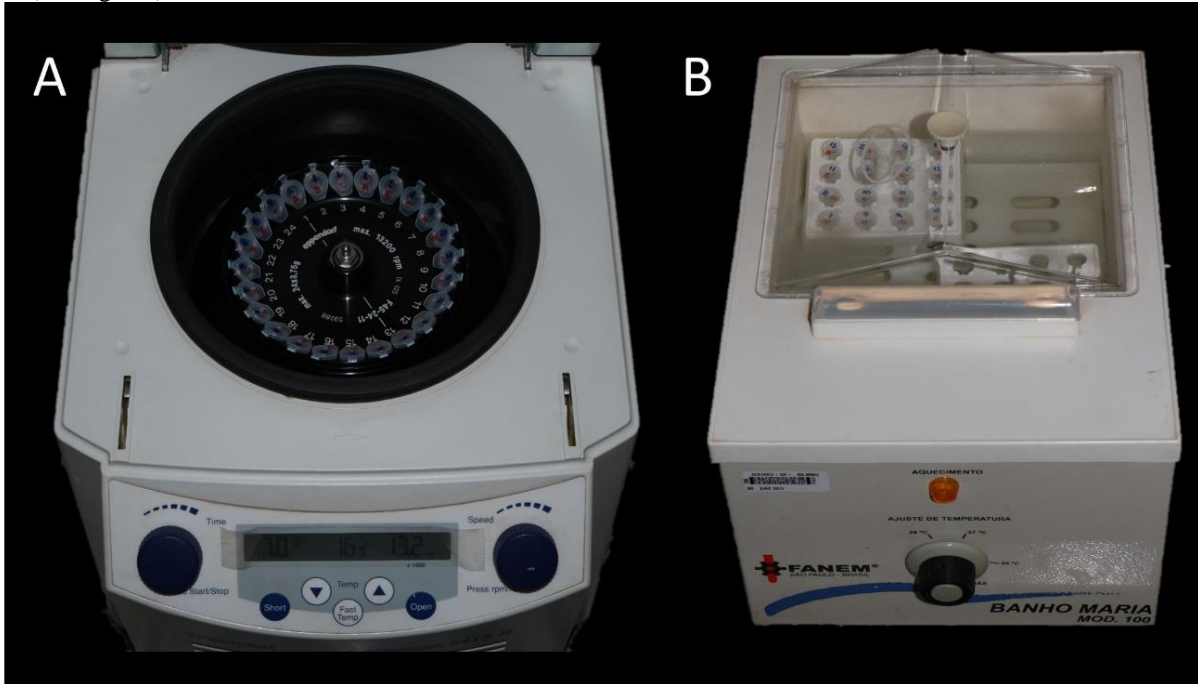
**Tabela 1.** Bibliotecas construídas para a caracterização dos biofilmes pela técnica de sequenciamento genético. T1= 1 ano após instalação da prótese.; T2 = 2 anos após instalação da prótese.; T3 = 3 anos após instalação da prótese.

Biblioteca	Conteúdo das amostras
1	Titânio teste supragengival (T1)
2	Titânio teste submucoso (T1)
3	Titânio controle supragengival (T1)
4	Titânio controle subgengival (T1)
5	Zircônia teste supragengival (T1)
6	Zircônia teste submucoso (T1)
7	Zircônia controle supragengival (T1)
8	Zircônia controle subgengival (T1)
9	Titânio teste supragengival (T2)
10	Titânio teste submucoso (T2)
11	Titânio controle supragengival (T2)
12	Titânio controle subgengival (T2)
13	Zircônia teste supragengival (T2)
14	Zircônia teste submucoso (T2)
15	Zircônia controle supragengival (T2)
16	Zircônia controle subgengival (T2)
17	Titânio teste supragengival (T3)
18	Titânio teste submucoso (T3)
19	Titânio controle supragengival (T3)
20	Titânio controle subgengival (T3)
21	Zircônia teste supragengival (T3)
22	Zircônia teste submucoso (T3)
23	Zircônia controle supragengival (T3)
24	Zircônia controle subgengival (T3)

**Figura 6.** Divisão e homogeneização das amostras. A: Imagem ilustrando parte das amostras de biofilme coletadas, após homogeneizadas, sendo agrupadas de acordo com a biblioteca correspondente. B: Tubos tipo Eppendorf contendo as 360 amostras agrupadas em 24 bibliotecas de acordo com o sítio de coleta.



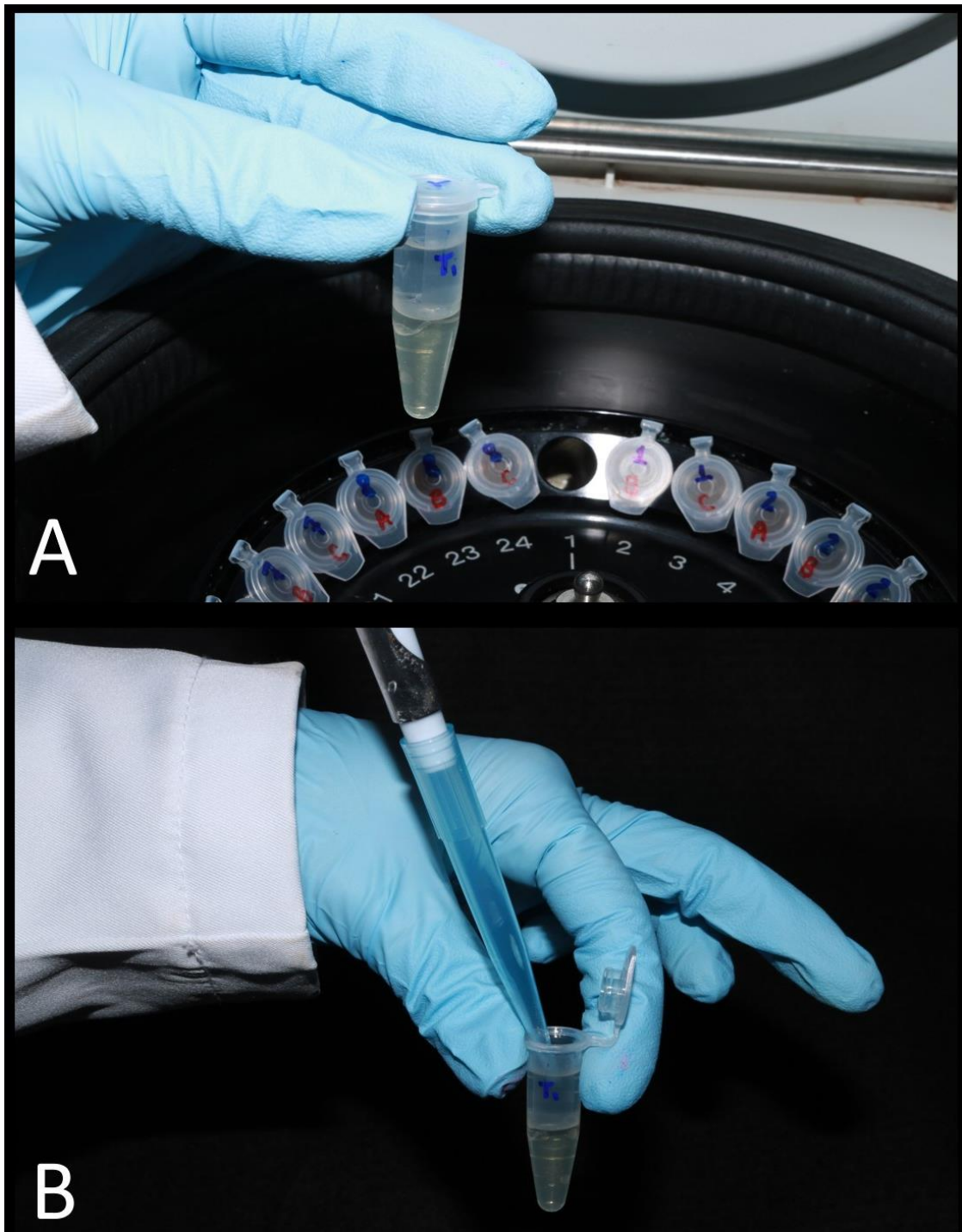
**Figura 7.** Extração e purificação das amostras. A: microtubos contendo as amostras foram centrifugados a 13200 rpm durante 7 minutos para precipitar as células e remover o conteúdo sobrenadante; B: Microtubos incubados a 65°C em banho maria durante 30 minutos, após adição de 700 µL do tampão CTAB de extração com proteinase K (100mg/mL).



O DNA foi então precipitado com 1 volume de isopropanol em temperatura ambiente e centrifugado em 13200 rpm por 7 minutos. A solução sobrenadante dos microtubos foi removida e o DNA precipitado é purificado com 50 µL de etanol 70% e centrifugados a 13200 rpm durante 2 minutos. Este procedimento de purificação foi repetido por 3 vezes para a remoção dos excessos de sais e carboidratos. Após a lavagem, todo o etanol foi removido e os microtubos permaneceram a temperatura ambiente durante 30 minutos para secagem. Posteriormente, o DNA foi resuspendido com a adição de 20 µL de solução tampão TE e 1 µL de RNase 20 µg/mL em cada tubo, seguido pela incubação em banho maria a 37°C durante 30 minutos.

Uma alíquota (na diluição de 1:50) de cada tubo contendo o material genético extraído foi quantificado no aparelho espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu, Japão), onde os dados obtidos foram tabelados, e sua qualidade e integridade foram verificadas em gel de agarose 0,8% (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

**Figura 8.** Extração e purificação das amostras. A: Microtubos após serem centrifugados a 13200 rpm por 7 minutos para formação de duas fases (fase aquosa e orgânica). B: Remoção cuidadosa da fase aquosa do microtubo.



### 3.5.2.2. Quantificação do DNA extraído

Uma alíquota (na diluição de 1:50) de cada tubo contendo o material genético extraído foi quantificada no aparelho espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu, Japão) e sua qualidade e integridade foram verificadas em gel de agarose 0,8% (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

### 3.5.2.3. Amplificação do material genético extraído pela técnica do 16S rDNA-based PCR

Todas as amostras foram amplificadas pela técnica do 16S rRNA-based PCR para posterior avaliação por sequenciamento do 16S DNA ribossômico (rRNA), sequência bastante utilizada na identificação genética de bactérias. Durante o protocolo de amplificação, as amostras foram transferidas para 24 microtubos, onde ocorreram reações individuais, sendo que cada um deles apresentavam 2 µL de DNA extraído (5 ng), ao qual foram adicionados 2,5 µL de 10X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,5 µL de MgSO<sub>4</sub> 50 mM; 0,5 µL de 10 mM dNTP mix (Invitrogen); 0,5 µL de primer *reverse* 10 µM; 0,5 µL de primer *forward* 10 µM e 0,1 µL de Taq polimerase (Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5U / µL). O volume final de cada microtubo foi completado até 25 µL com água ultra pura (Nuclease-Free Water, ThermoFisher Scientific). Como controle negativo, foi preparado um microtubo contendo todos os componentes da PCR e 2 µL de água ultra pura ao invés do DNA extraído.

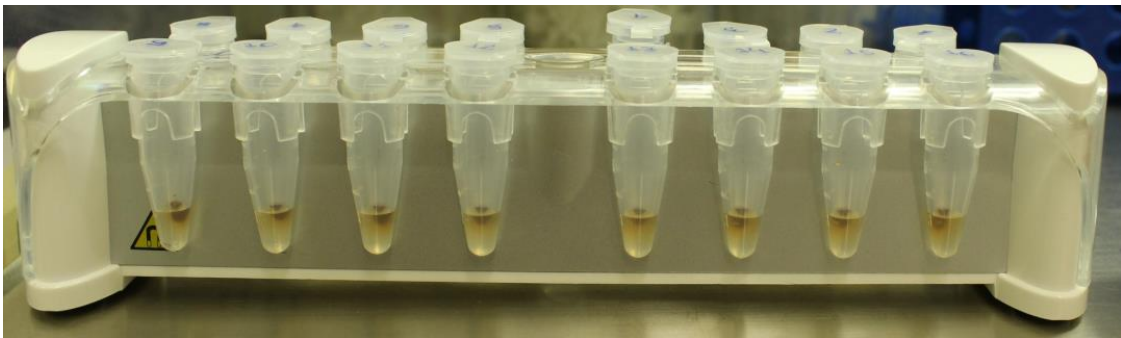
Os microtubos foram levados ao termociclador (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA). Foram realizados 35 ciclos por reação, respeitando as seguintes condições: etapa de desnaturação de 30 segundos a 94°C, etapa de anelamento de 30 segundos a 50,4°C e etapa de extensão de 60 segundos a 68°C. Todas as amostras amplificadas, produtos da reação de PCR, foram submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sigma) para verificação da integridade de sua estrutura e determinação do peso molecular. Para esta análise, foram depositados 5 µL de DNA de cada produto de PCR individualmente nos poços da cuba de eletroforese, aos quais foram adicionados 6 µL de Gel Red e 2 µL de Loading Buffer (6X). Para o marcador de peso molecular, foram depositados 15 µL de 1Kb DNA Ladder (0,9 µg) e 6 µL de Gel Red.

### 3.5.2.4. Purificação dos Amplicons obtidos pela técnica do 16S rRNA-based PCR

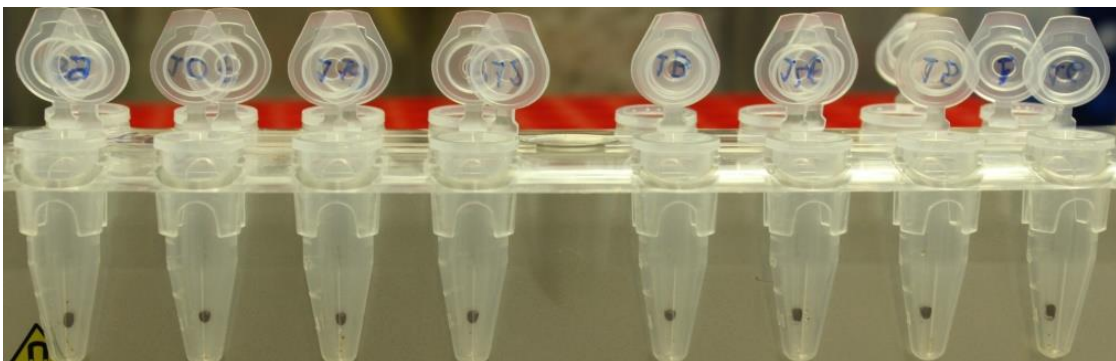
Após a amplificação, as amostras foram purificadas pelo método de *beads* magnéticas (AMPure XP Beads). Inicialmente, 5 µL de água destilada ultrapura (Invitrogen®) e 20 µL do reagente AMPure XP Beads foram adicionados a tubos para PCR. A seguir, 20 µL de cada

amostra amplificada foram adicionados a estes tubos preparados previamente. Os tubos foram homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos, tempo necessário para que o DNA presente nas amostras se ligasse às *beads*. Após este período, os tubos foram inseridos em estante magnética, onde permaneceram durante 2 minutos, todo o DNA presente na amostra sofreu atração pela estante magnética e o sobrenadante foi removido (Figuras 9 e 10).

**Figura 9.** Imagem representativa dos microtubos contendo as amostras e *beads* posicionados na estante magnética.



**Figura 10.** Imagem representativa atraído pela estante magnética após remoção do sobrenadante.



Após a remoção do sobrenadante, 200  $\mu\text{L}$  de etanol 80% foi adicionado em cada microtubo com a finalidade de eliminar resíduos. Os tubos foram homogeneizados e reposicionados na estante magnética durante 30 segundos e o sobrenadante foi removido, este procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. Em cada tubo foram adicionados 52,5  $\mu\text{L}$  de Tris 10 mM pH 8,5 e homogeneizados durante 5 segundos para o desprendimento do DNA das *beads*. A seguir, os tubos foram reposicionados em estante magnética onde permaneceram por 2 minutos à temperatura ambiente. Com os tubos ainda na estante, todo o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos.

### 3.5.2.5. Preparo das bibliotecas e amplificação por PCR em emulsão

Esta etapa teve por objetivo incluir *barcodes* específicos para cada biblioteca construída; no total, foram preparadas 24 bibliotecas para o estudo (24 diferentes combinações de Index). A combinação de 5  $\mu\text{L}$  de primers Index 1 (N701 – N712) e primers Index 2 (S501 – S504) (Kit index Nextera XT) contendo sequências de adaptadores específicas foram distribuídas em uma placa de 96 poços para PCR. Em seguida, foram adicionados nos poços 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra, 25  $\mu\text{L}$  2x KAPA Hifi HOTstart READ mix e 10  $\mu\text{L}$  de água, perfazendo um total de 50  $\mu\text{L}$  em cada poço. Após homogeneização em centrifuga (1000g, 1 minuto e 20°C) foram realizados 8 ciclos por reação utilizando um termociclador e respeitando as seguintes condições: etapa de desnaturação de 30 segundos a 95°C, etapa de anelamento de 30 segundos a 55°C e etapa de extensão de 30 segundos a 72°C. Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram purificados pelo método de *beads* magnéticas (AMPure XP Beads) de forma semelhante ao protocolo descrito anteriormente.

### 3.5.2.6. Quantificação das bibliotecas por Fluorimetria

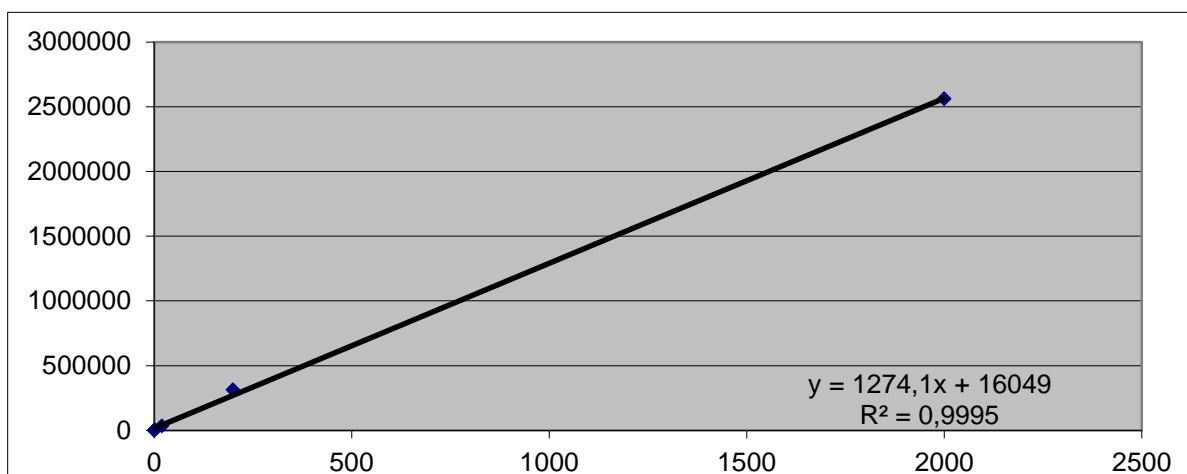
Para a quantificação dos produtos de amplificação por fluorimetria, foi utilizado o kit de fluorescência *QuantiFluor dsDNA* (Promega). Inicialmente, uma curva com 4 diluições do DNA controle ( $\lambda\text{DNA}$ ) e um branco (sem DNA) foi constituída para servir de base de comparação para a quantidade dos DNAs amplificados. As amostras amplificadas foram diluídas na proporção de 1:100, sendo 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra para 98  $\mu\text{L}$  de Tris- EDTA. Após o preparo dos controles e amostras, o kit de fluorescência foi diluído 200x em TE 1X. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do kit diluído e 50  $\mu\text{L}$  dos controles e das amostras. As amostras e controles foram submetidas à análise em aparelho espectrofluorímetro. Ao final da leitura dos controles (Tabela 2), foi construído um gráfico com uma curva gerada pelos dados obtidos (Figura 11). Através da fórmula gerada pela curva controle e os dados obtidos na leitura de cada amostra, calculou-se a quantidade de DNA produzida em cada reação de amplificação.



**Tabela 2.** Os valores de referência da curva controle, subtraídos do branco Curva controle para a quantificação dos DNAs amplificados

Controle	Concentração Final	Mensuração Fluorescência
1	2 ng/ $\mu$ L	2560076
2	200 pg/ $\mu$ L	313301
3	20 pg/ $\mu$ L	34544
4	2 pg/ $\mu$ L	3357
5	0	0

**Figura 11.** Equação gráfica para o cálculo da concentração dos DNAs amplificados.



### 3.5.2.7. Quantificação das bibliotecas por PCR Real Time

Para obter a concentração exata das bibliotecas que apresentarem os *barcodes* associados ao gene 16S, foi realizada a quantificação por PCR Real Time com Kit para plataformas Illumina (KAPA Library Quantification Kit, Illumina® Platforms). Com base na quantificação obtida por Fluorimetria, as bibliotecas foram diluídas na proporção de 1:1000 ou 1:100000 com solução tampão [Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 - 8,5 (25 ° C) + 0,05% Tween® 20], etapa necessária para manter a concentração das bibliotecas dentro da variação da curva padrão (20 pM a 0,0002 pM). Em um microtubo foi adicionado 1 mL de Primer Premix (10X) (contendo os seguintes primers: Primer 1: 5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA-3 ' e Primer 2: 5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA-3 ') e 5 mL do reagente KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X), formando o reagente Mix. Em uma placa de 96 poços para PCR foi adicionado 4  $\mu$ L de cada biblioteca ou 4  $\mu$ L das 6 diluições de DNA Standard, 12  $\mu$ L do reagente

Mix e 4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Invitrogen®) em triplicata, totalizado 20  $\mu\text{L}$  em cada poço. Após o preenchimento dos poços, a placa foi devidamente selada com uma película seladora e transferida para o termociclador (Eppendorf, modelo mastercycler realplex egradient S) para amplificação das amostras, seguindo o protocolo de ciclagem descrito na Figura 12.

Ao fim do processo de amplificação, foram obtidos os valores da concentração final de cada uma das bibliotecas. Com base nesses dados, parte do produto obtido foi diluído para obter 5  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca na concentração de 4 nM e confeccionado um *Pool* das bibliotecas por meio da união dessas amostras diluídas. Em seguida, para verificar o tamanho (630 pares de base) e a integridade dos *Amplicons* obtidos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%.

**Figura 12.** Protocolo de ciclagem utilizado para amplificação das amostras.

ETAPA	TEMPERATURA	DURAÇÃO	CICLOS
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	35
Anelamento/extensão e aquisição de dados	60°C	45 segundos	
Análise da curva	65 - 95°C		

### 3.5.2.8. *Sequenciamento das bibliotecas*

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma MiSeq Illumina®. Inicialmente, um volume de 5  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca (*pool* 4nM) foi desnaturado com NaOH (0,2 N), seguido por uma diluição para se obter a concentração final de 10 pM, adicionado de PhiX controle e incubados a 96°C por 2 minutos. Após a incubação, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo por 5 minutos. Na sequência, foram transferidos para uma lâmina de fluxo, onde foi realizado o sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina®. As leituras (*reads*) obtidas foram pareadas utilizando a plataforma UseGalaxy® (Afgan et al., 2016) e o seu comprimento final foi ajustado para o tamanho padrão de 165 bp, conforme recomendação do protocolo Illumina. A análise de todas as sequências foi realizada por meio do servidor Metagenomics RAST (MG-Rast versão 3), que permite a análise filogenética e funcional dos metagenomas obtidos utilizando diversas bases de dados (ITS, Greengens, Silva LSU, M5RNA, RDP e Silva SSU). As bibliotecas foram agrupadas em filotipos com um mínimo de similaridade de 98% (Parâmetros: *minimum cutoff* 98%, *maximum e-value*  $1 \times 10^{-5}$ , *minimum alignment length cutoff* 165bp; Meyer et al., 2008; Melo et al., 2016 ) e a base de dados Silva SSU (QUAST et al., 2013).

### 3.5.3. Determinação dos índices de diversidade alfa e beta

As medições de diversidade microbiana foram baseadas em unidades de taxonomia operacional (OTUs) em nível de gênero. Riqueza (medida de OTUs realmente observado nas amostras), índice de riqueza de Margalef e curvas de rarefação foram usadas para medir a riqueza microbiana. A diversidade microbiana com base no índice de Shannon-Wiener e índice de Simpson foram usados para fornecer inferência sobre a composição da comunidade de titânio e conectores de zircônia, contemplando a abundância relativa de diferentes táxons que abrigam diferentes substratos. Estimadores de riqueza Chao1 e Estimador de Cobertura Baseado em Abundância (ACE) foram calculados para estimar a riqueza total de uma comunidade a partir de uma amostra, comparando estimativas de gêneros raros entre amostras. A diversidade beta foi também estimada pela similaridade entre diferentes comunidades usando a Distância de semelhança de Jaccard.

### 3.6. Avaliação dos indicadores clínicos

Os exames clínicos peri-implantar e periodontal foram realizados com o objetivo de avaliar, ao longo do tempo, a influência do biofilme na manutenção da saúde dos tecidos de suporte ou no possível desenvolvimento da doença peri-implantar. Os indicadores clínicos de profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival, foram avaliados por meio do sistema computadorizado de sondas periodontais Florida Probe® (Florida Probe® System, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA), com alta precisão (0,2 mm) e pressão controlada (15 g) (GIBBS et al., 1988; GUPTA; RATH; LOHRA, 2015). Os exames foram realizados por um mesmo examinador previamente calibrado e com experiência no sistema utilizado. Os dados foram coletados no momento da instalação das próteses (T0: baseline) e após 12 (T1), 24 (T2) e 36 (T3) meses de função mastigatória dos implantes. Os indicadores clínicos foram investigados nos sítios reabilitados com implante/coroa protética e nos dentes contralaterais aos sítios com implantes.

Para avaliação da profundidade de sondagem, foram mensuradas as distâncias, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco peri-implantar e periodontal. O sangramento à sondagem foi registrado quanto à ausência ou presença após 30 segundos transcorridos da avaliação da profundidade de sondagem. Para o registro da recessão gengival, foi mensurado o valor em milímetros da distância entre a linha de união da coroa e o conector protético e a margem gengival livre. As medições foram todas feitas em seis sítios distintos: méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, méso-lingual/palatino, lingual/palatino e disto-lingual/palatino. Cada sítio foi sondado duas vezes

para minimizar potenciais erros na angulação da sonda e a média das duas avaliações foi utilizada como medida representativa para o sítio (Figura 13).

### 3.7. Avaliação radiográfica

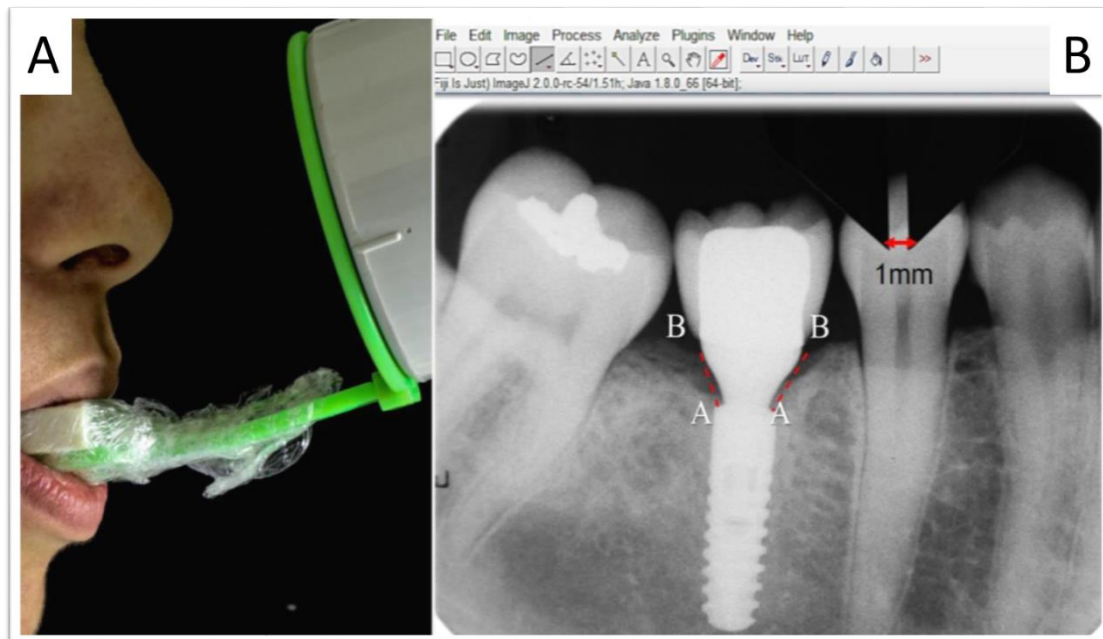
Radiografias periapicais foram também realizadas em cada etapa experimental (T0, T1, T2 e T3), com o objetivo de monitorar o nível ósseo marginal ao redor dos implantes. Todas as tomadas radiográficas foram obtidas por meio da técnica do paralelismo utilizando um dispositivo oral para o posicionamento do filme radiográfico periapical (Kodak E-Speed, Kodak, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), e aparelho de Raio-X (Timex 70E - parede, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil; Figura 14A). O processamento radiográfico foi realizado em uma máquina processadora automática (Peri-ProIII, OdontoMed, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

As radiografias periapicais foram fotografadas sobre um negatoscópio (Biotron, Minas Gerais, Brasil) com auxílio de uma câmera fotográfica digital (Canon, Japão) fixada numa mesa estativa. Sobre a imagem radiográfica foi posicionado um paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo, Brasil) marcando 1mm de comprimento, utilizado para estabelecer uma escala de referência para as mensurações. O nível ósseo marginal foi medido com o auxílio do software ImageJ-Fiji 1.43 (NIH, EUA). As mensurações foram realizadas nas faces mesial e distal de cada implante. Um ponto fixo (A) foi definido sobre a plataforma de cada implante para ser utilizado como o ponto de referência, e um segundo ponto (B) foi posicionado sobre a região mais alta da crista óssea marginal. Desta forma, em todos os períodos realizou-se a mensuração, em milímetros, da distância A para B (SALVI; LANG, 2004) (Figura 14B).

**Figura 13** – Imagem representativa da avaliação da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e recessão gengival por meio do sistema Florida Probe®.



**Figura 14** – A: Técnica do paralelismo para obtenção de radiografias periapicais; B: Mensuração do nível ósseo marginal (região mesial e distal) por meio do *Software* ImageJ-Fiji 1.43. Seta vermelha: calibração da escala (em mm) com paquímetro digital. A: ponto de referência na plataforma do implante. B: ponto sobre a região mais alta da crista óssea alveolar.



### 3.8. Análise dos dados

Todos os dados clínicos e radiográficos obtidos ao longo dos períodos de investigação foram submetidos à análise estatística descritiva. Considerando-se o tamanho amostral do estudo e a dependência longitudinal dos fatores de variação, os dados foram inicialmente comparados por um modelo não-paramétrico de regressão linear mista (Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments; BRUNNER & LANGER, 1999). As variáveis clínicas e os fatores de variação foram tratados como efeitos fixos e o participante como efeito aleatório. *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) foram usados para investigar a hipótese de ausência de interação entre os fatores substrato e tempo. Para investigar se a ausência de interação entre os diferentes substratos deve ser rejeitada em cada período de avaliação, múltiplas comparações foram realizadas por meio do teste de *Friedman-Conover*, corrigido por *Benjamini-Hockberg False Discovery Rate* (FDR). Os resultados das análises de reabsorção óssea marginal foram representados como média e desvio-padrão, por apresentarem distribuição normal, e o teste utilizado para a comparação entre os grupos foi o *Two-Way ANOVA*. Diferenças foram consideradas significantes para valores de  $p < 0,05$ .

A diversidade microbiana foi avaliada usando o número de táxons registrados nos grupos avaliados. Significado das diferenças de diversidade entre os locais de coleta foram procurados por ANOVA seguido por Diferença Significativa Honesta de Tukey (HSD). Para investigar o quão perto cada par de sítios é um para o outro, os grupos foram agrupados usando a distância métrica de Jaccard. A influência do tempo de carga na diversidade foi avaliada por um modelo de regressão linear mista. A análise não paramétrica de Brunner e Langer de dados longitudinais em experimentos fatoriais foi aplicada para comparar contagens de patógenos periodontais entre os grupos ao longo do tempo. As correlações entre os achados microbiológicos e os parâmetros clínicos foram analisadas com o coeficiente de correlação de postos de Spearman (Rs). Assumiu-se que as contagens de OTUs têm distribuições de Poisson enquanto os índices de diversidade têm distribuição normal. Poisson é comumente usado na análise de dados de séries temporais porque fornece uma estrutura flexível que pode acomodar muitas estruturas de autocorrelação. A significância estatística foi estabelecida no nível  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas usando *vegan*, *ggpubr* e *nparLD* no *software* estatístico R (R. software 3.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

*Resultados*

---





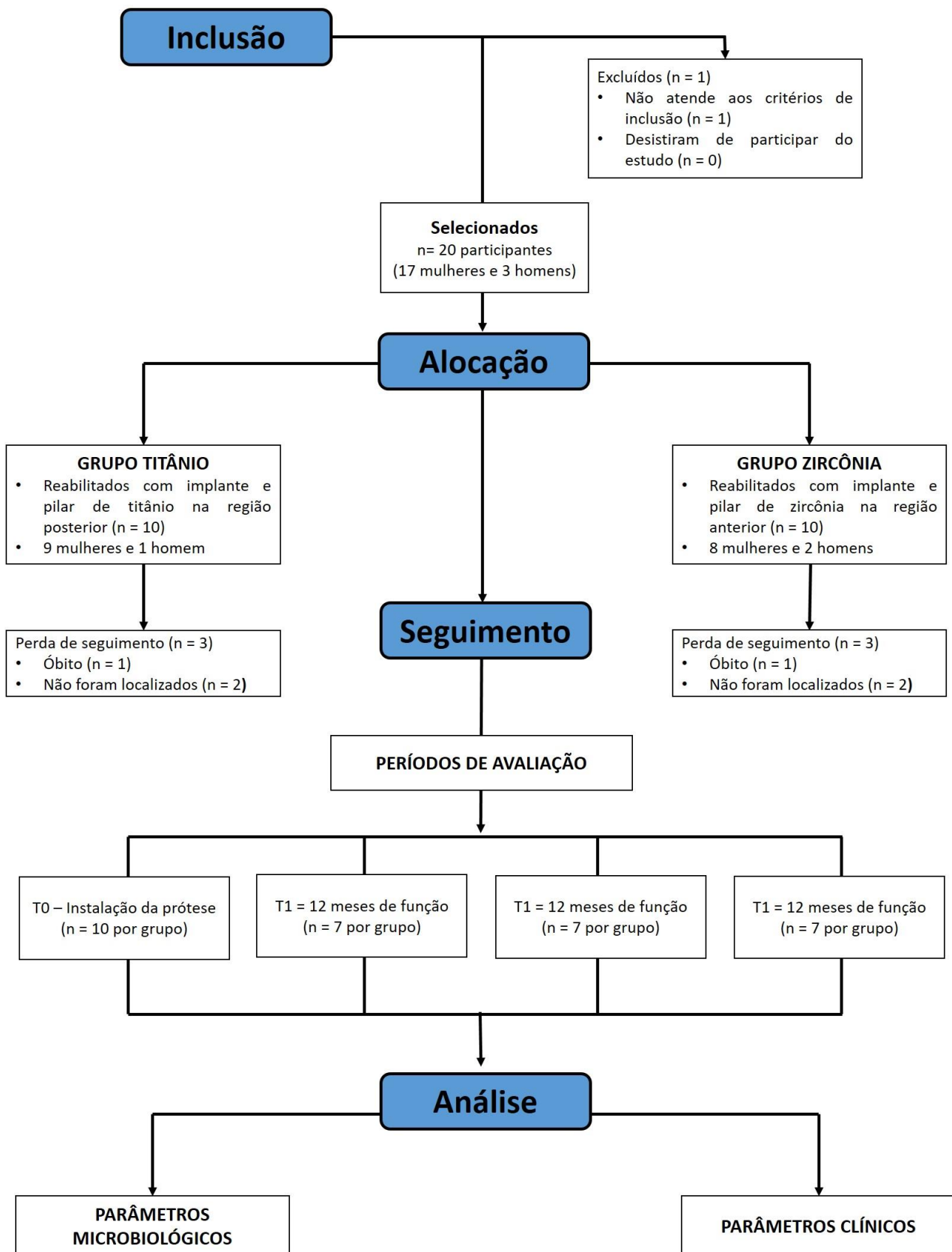
## 4. RESULTADOS

### 4.1. População Amostral

Os 20 participantes da primeira fase deste estudo foram contactados e recrutados para esta segunda etapa da pesquisa. O cálculo amostral realizado havia estimado uma perda de 20% de segmento ao longo do estudo, porém, após 12 meses de acompanhamento, foi observado uma perda de segmento de 30% em ambos os grupos. Duas perdas de segmento ocorreram por motivo de óbito e quatro participantes não foram localizados. Apesar da perda de segmento ter ocorrido maior que o esperado, análises estatísticas realizadas ao final do estudo, comparando resultados com e sem perda de segmento, mostraram que a perda de segmento acima do esperado não causou alteração significativa nos resultados. Dessa forma, foram avaliados, e realizada a coleta de dados populacionais, em 10 indivíduos por grupo no momento de instalação da prótese (T0), e 7 indivíduos por grupo após 12 meses (T1), 24 meses (T2) e 36 meses (T3) de função. Além dos grupos testes (Titânio e Zircônia), também foi realizada a coleta de dados dos dentes contralaterais, estes foram utilizados como parâmetro de controle para a comparação com os substratos investigados.

A Figura 15 apresenta o fluxograma contendo dados do recrutamento, alocação e acompanhamento dos participantes do estudo e a Tabela 3 apresenta a distribuição de participantes considerando gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, por grupo (titânio ou zircônia) e controle (dente contralateral), nos diferentes tempos investigados (T0, T1, T2 e T3). A Tabela 4 descreve o número total de amostras de biofilme coletados por grupo ao longo dos 3 anos.

Figura 15. Fluxograma contendo os dados de seleção, alocação e seguimento e análise do estudo.



**Tabela 3.** Distribuição da amostra por grupo, titânio ou zircônia, considerando gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, nos diferentes períodos investigados.

	Grupo Titânio							
	Implante				Dente contralateral (controle)			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
N° de participantes	10	7	7	7	10	7	7	7
Média de idade (anos ±DP)	48±3,6	37±16,9	37±16,9	37±16,9	48±3,6	37±16,9	37±16,9	37±16,9
Gênero (Fem./Masc.)	9/1	6/1	6/1	6/1	9/1	6/1	6/1	6/1
Sítios de amostragem	60	42	42	42	60	42	42	42

	Grupo Zircônia							
	Implante				Dente contralateral (controle)			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
N° de participantes	10	7	7	7	10	7	7	7
Média de idade (anos ±DP)	47±4,2	44±16,0	44±16,0	44±16,0	47±4,2	44±16,0	44±16,0	44±16,0
Gênero (Fem./Masc.)	8/2	5/2	5/2	5/2	8/2	5/2	5/2	5/2
Sítios de amostragem	60	42	42	42	60	42	42	42

T0: *baseline*; T1: 12 meses após função; T2: 24 meses após função; T3: 36 meses após função  
 Fem: Feminino; Masc: Masculino  
 DP: desvio-padrão

**Tabela 4.** Distribuição da amostra por grupo, titânio ou zircônia, considerando gênero, idade e número de sítios avaliados para cada variável clínica, nos diferentes períodos investigados.

	Grupo Titânio								
	Implante				Dente contralateral				TOTAL
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	
N° total de amostras de biofilme supragengival (1 coleta)	10	7	7	7	10	7	7	7	62
N° total de amostras de biofilme subgengival/submucoso (2 coletas)	20	14	14	14	20	14	14	14	82
<b>TOTAL</b>									<b>144</b>

	Grupo Zircônia								
	Implante				Dente contralateral				TOTAL
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	
N° total de amostras de biofilme supragengival (1 coleta)	10	7	7	7	10	7	7	7	62
N° total de amostras de biofilme subgengival/submucoso (2 coletas)	20	14	14	14	20	14	14	14	82
<b>TOTAL</b>									<b>144</b>

T0: *baseline*; T1: 12 meses após função; T2: 24 meses após função; T3: 36 meses após função

## 4.2. Resultados Microbiológicos

### 4.2.1. Extração do DNA genômico das amostras

Na Tabela 5 estão representadas as concentrações de DNA genômico obtidas para cada *Pool* de amostras, ou seja, amostras de biofilmes de todos os participantes do mesmo grupo (Titânio ou Zircônia) e dente contralateral (controle) em diferentes tempos (T1, T2 e T3), e a razão entre as leituras das absorbâncias 260/280nm, indicativo do grau de pureza dos DNAs extraídos.

**Tabela 5.** Valores da concentração e razão de absorbância (A260nm /A280nm) do DNA extraído das amostras em aparelho espectrofotômetro.

Biblioteca	Concentração ng/μL	Razão (A260nm /A280nm)
<b>Titânio</b> teste supragengival (T1)	44,86	1.6
<b>Titânio</b> teste submucoso (T1)	41,20	1.6
<b>Titânio</b> controle supragengival (T1)	43,64	1.4
<b>Titânio</b> controle subgengival (T1)	44,25	1.7
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T1)	36,93	1.7
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T1)	35,40	1.5
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T1)	31,74	1.6
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T1)	30,52	1.4
<b>Titânio</b> teste supragengival (T2)	31,43	1.7
<b>Titânio</b> teste submucoso (T2)	29,91	1.4
<b>Titânio</b> controle supragengival (T2)	52,49	2.0
<b>Titânio</b> controle subgengival (T2)	23,19	1.5
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T2)	43,03	1.9
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T2)	26,25	1.4
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T2)	17,70	1.6
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T2)	20,75	1.3
<b>Titânio</b> teste supragengival (T3)	46,69	1.6
<b>Titânio</b> teste submucoso (T3)	39,06	1.8
<b>Titânio</b> controle supragengival (T3)	53,10	1.5
<b>Titânio</b> controle subgengival (T3)	26,55	1.4
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T3)	32,35	1.2
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T3)	42,72	1.4
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T3)	27,16	1.2
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T3)	20,14	1.6

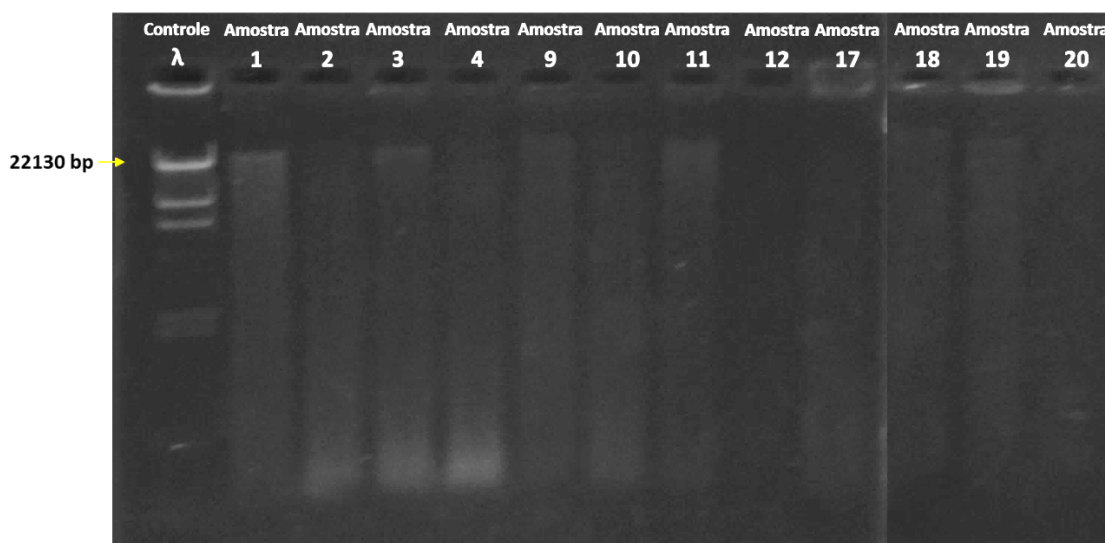
T1: 12 meses após função; T2: 24 meses após função; T3: 36 meses após função

Controle: dente contralateral

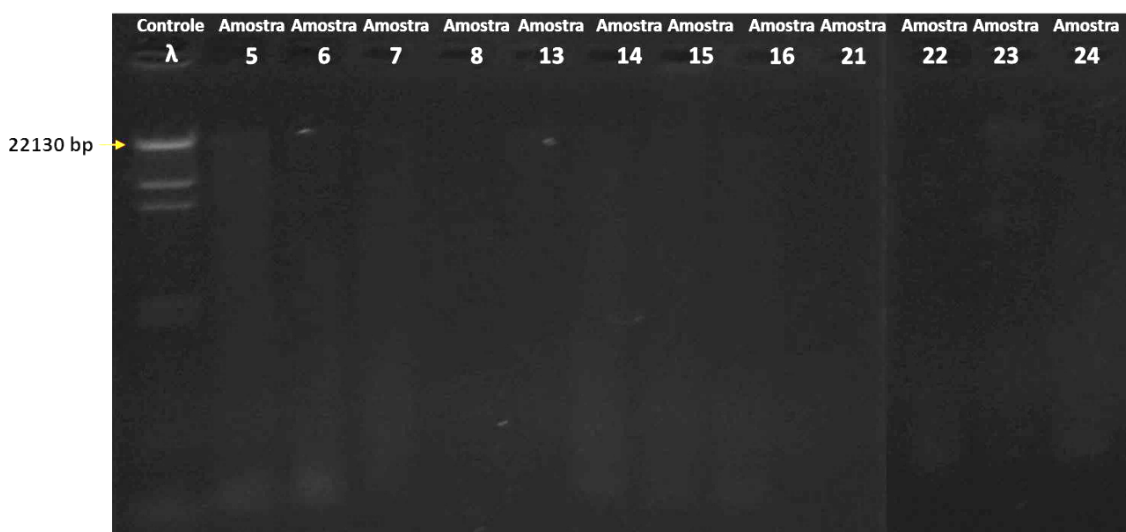
#### 4.2.2. Avaliação da qualidade e integridade dos DNAs genômicos extraídos em gel de agarose 0,8%

As figuras 16 e 17 ilustram a reação de eletroforese em gel de agarose 0,8% dos DNAs genômicos das amostras obtidas após processo de extração. A avaliação no espectrofotômetro mostrou uma baixa concentração de DNA extraído nas amostras, o que justifica a presença de fracas bandas de DNA no gel de agarose após eletroforese.

**Figura 16.** Análise das amostras do DNA genômico do grupo titânio em gel de agarose 0,8%.  $\lambda$ : marcador de peso molecular fago lambda digerido com HindIII. Amostras 1 a 24: bibliotecas descritas na Tabela 1.



**Figura 17.** Análise das amostras do DNA genômico do grupo zircônia em gel de agarose 0,8%.  $\lambda$ : marcador de peso molecular fago lambda digerido com HindIII. Amostras 1 a 24: bibliotecas descritas na Tabela 1.



#### 4.2.3. Amplificação do material genético extraído pela técnica do 16S rRNA-based PCR

Na Tabela 6 estão dispostos os valores das concentrações dos DNAs amplificados, gerados com base na equação gráfica obtida pela curva controle, após leitura em aparelho espectrofluorímetro.

**Tabela 6.** Valores das leituras de fluorescência em aparelho espectrofluorímetro das bibliotecas (*Pool* de amostras) de PCR dos genes 16S rRNA, proveniente dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle), e suas respectivas concentrações.

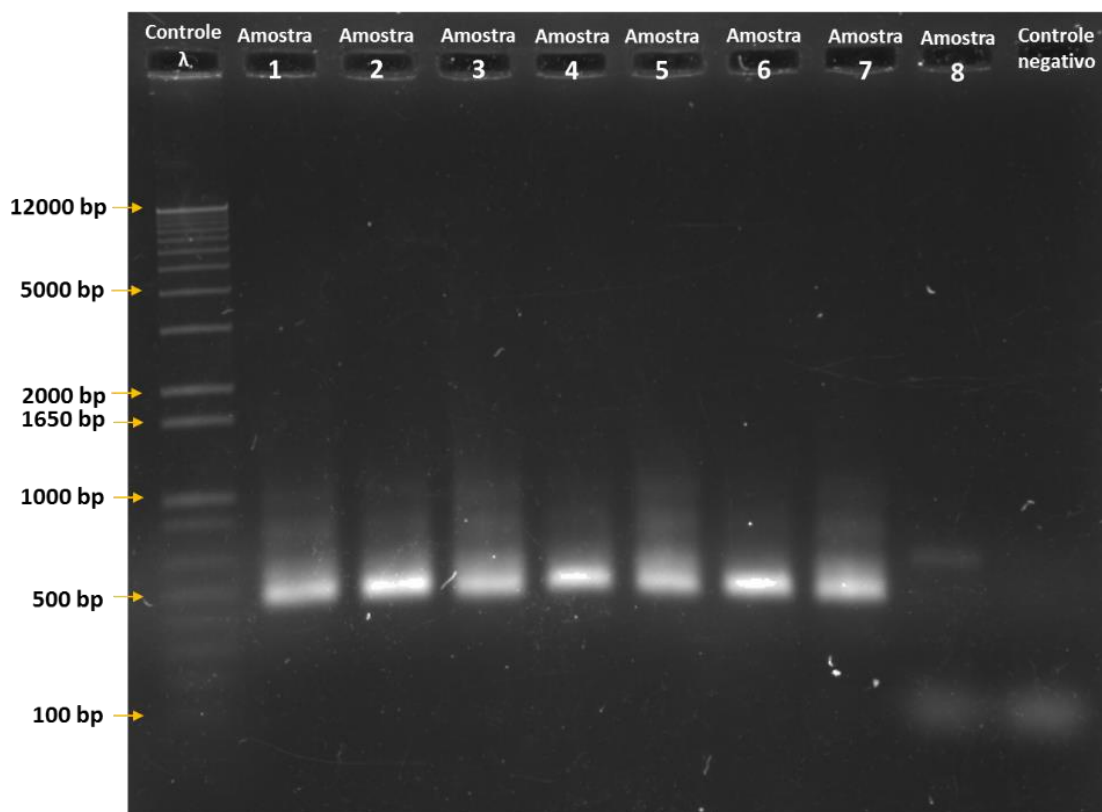
Biblioteca	Fluorescência	Concentração (nM)
<b>Titânio</b> teste supragengival (T1)	229476	20,14
<b>Titânio</b> teste submucoso (T1)	429263	39,00
<b>Titânio</b> controle supragengival (T1)	2518992	236,23
<b>Titânio</b> controle subgengival (T1)	270288	24,00
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T1)	355565	32,04
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T1)	239681	21,11
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T1)	1094007	101,74
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T1)	1377	0,02
<b>Titânio</b> teste supragengival (T2)	287315	25,60
<b>Titânio</b> teste submucoso (T2)	2727160	255,88
<b>Titânio</b> controle supragengival (T2)	1784113	166,87
<b>Titânio</b> controle subgengival (T2)	238753	21,02
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T2)	263753	23,38
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T2)	237160	20,87
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T2)	2349867	220,27
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T2)	6655	0,43
<b>Titânio</b> teste supragengival (T3)	2261220	211,90
<b>Titânio</b> teste submucoso (T3)	2179197	204,16
<b>Titânio</b> controle supragengival (T3)	536318	49,10
<b>Titânio</b> controle subgengival (T3)	724060	66,82
<b>Zircônia</b> teste supragengival (T3)	1982126	185,56
<b>Zircônia</b> teste submucoso (T3)	942250	87,42
<b>Zircônia</b> controle supragengival (T3)	2347389	220,03
<b>Zircônia</b> controle subgengival (T3)	2212971	207,35

T1: 12 meses após função; T2: 24 meses após função; T3: 36 meses após função  
Controle: dente contralateral

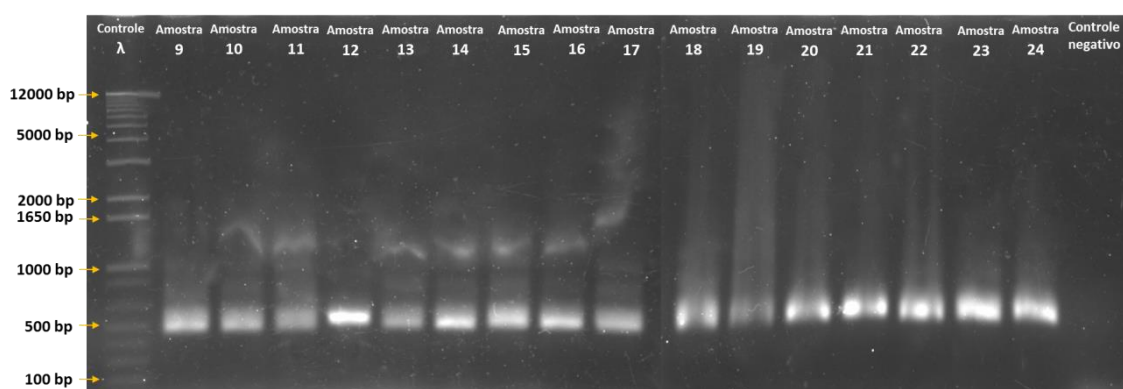
#### 4.2.4. Avaliação da qualidade e integridade material genético obtido após amplificação do 16S rRNA em gel de agarose 0,8%

As Figuras 18 e 19 ilustram a reação de eletroforese em gel de agarose 1%, onde pode ser observado um *amplicon* de aproximadamente 550 bp em todas bibliotecas (*Pool* de amostras), provenientes da amplificação do gene 16S rRNA das bactérias pelo método PCR.

**Figura 18.** Imagem da análise das amostras dos genes 16S rRNA amplificados do DNA genômico das bibliotecas (amostras) 1 a 8 (T1= 1 ano após instalação da prótese) em gel de agarose 0,8%.  $\lambda$ : marcador de peso molecular Ladder 1Kb. Amostras 1 a 24: bibliotecas descritas na Tabela 1.



**Figura 19.** Imagem da análise das amostras dos genes 16S rRNA amplificados do DNA genômico das amostras 9 a 24 (T2 e T3 - 1 e 2 anos após instalação da prótese, respectivamente) em gel de agarose 0,8%.  $\lambda$ : marcador de peso molecular Ladder 1Kb. Amostras 1 a 24: bibliotecas descritas na Tabela 1.



#### 4.2.5. Diversidade Microbiana

O desenho experimental permitiu investigar o perfil microbiológico dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia, e se houveram mudanças ao longo de um

período de 3 anos. Foram realizadas inferências sobre como as Unidades Taxonômicas Universais (OTUs) interagiram entre si dentro das comunidades microbianas, bem como as OTUs foram afetadas pelos diferentes substratos.

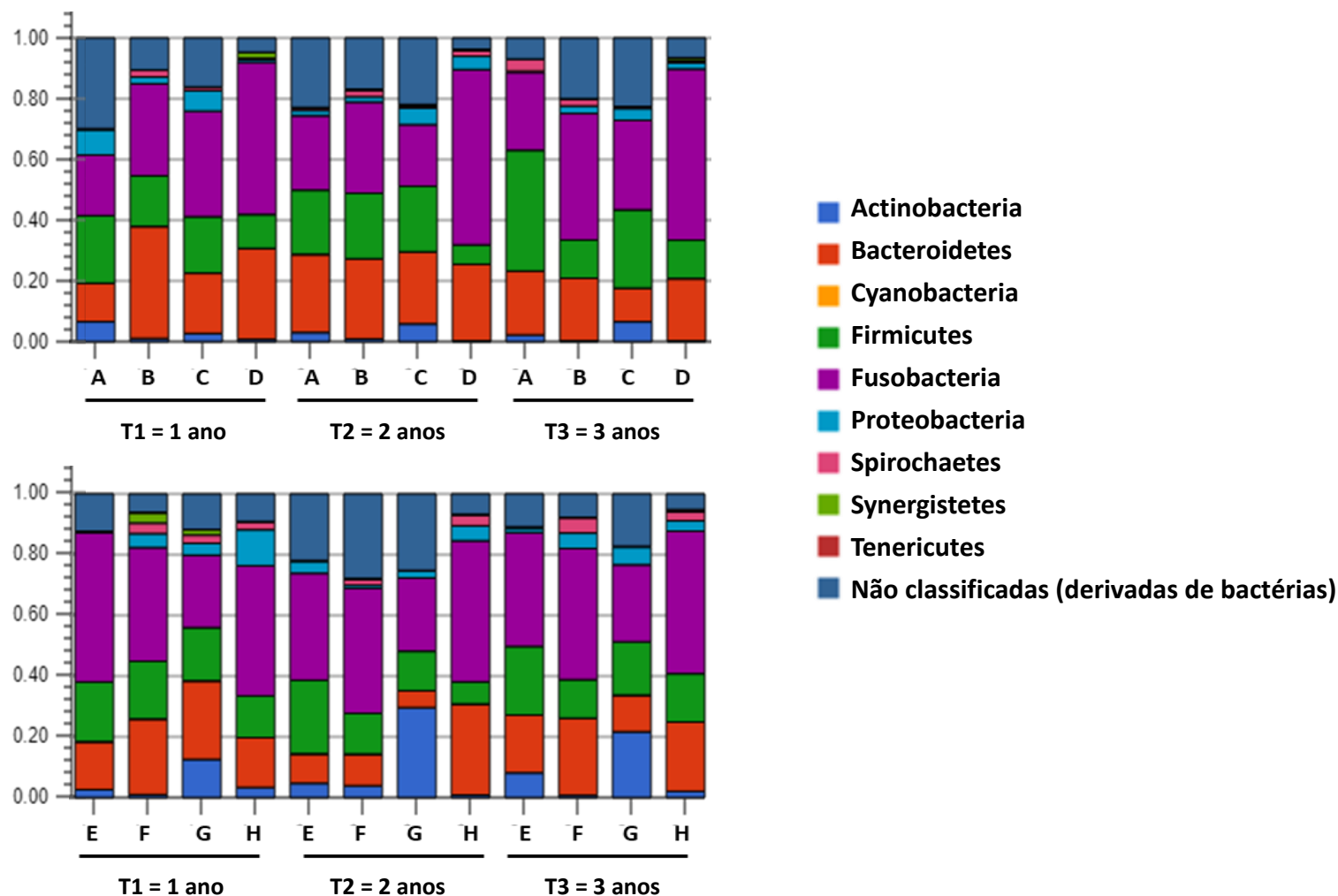
Ao todo, foram obtidas 144 amostras de biofilme tanto do grupo titânio quanto do grupo zircônia, totalizando 288 amostras de biofilme. De acordo com relatório de sequenciamento de rRNA gerado pela plataforma Illumina MiSeq, o número total de sequências geradas pelo sequenciamento foi de 8.493.166 com número médio de leituras por biblioteca de 353.884. Ao todo, 589 gêneros bacterianos foram registrados no conjunto de amostras.

As sequências identificadas representaram 9 diferentes filos, onde pôde-se observar uma distribuição filogenética, a nível de filo, semelhante entre os conectores protéticos investigados e os dentes contralaterais usados como controles, com maior prevalência média dos filos *Fusobacteria* (37,15%), *Bacteroidetes* (20,20%) e *Firmicutes* (17,53%) (Figura 20).

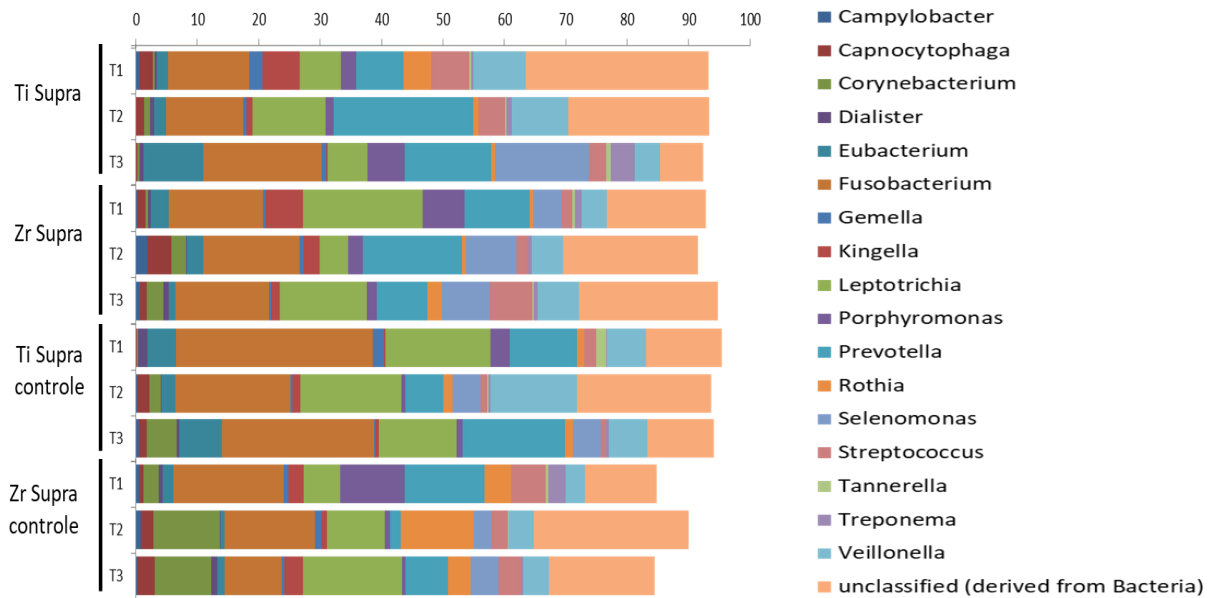
As figuras 21 e 22 ilustram a evolução do perfil microbiano, em nível de gênero, em amostras supra e subgingivais/submucosas associadas aos substratos investigados e seus respectivos dentes contralaterais (controle). Para ambos os grupos, uma maior prevalência relativa dos gêneros *Fusobacterium* e *Porphyromonas* foi observado nas amostras subgingivais e peri-implantares, enquanto os gêneros *Veillonella* e *Leptotrichia* foram mais prevalentes nas amostras supragingivais. Os gêneros *Actinobacillus*, *Bacteroidetes* e *Butyrivibrio* foram encontrados relacionados apenas ao titânio e os gêneros *Bulleidia*, *Micobacterium* e *Nitrobacter* apenas nas amostras do grupo zircônia. As contagens de OTUs e índices de diversidade alfa estão resumidos na Tabela 7.



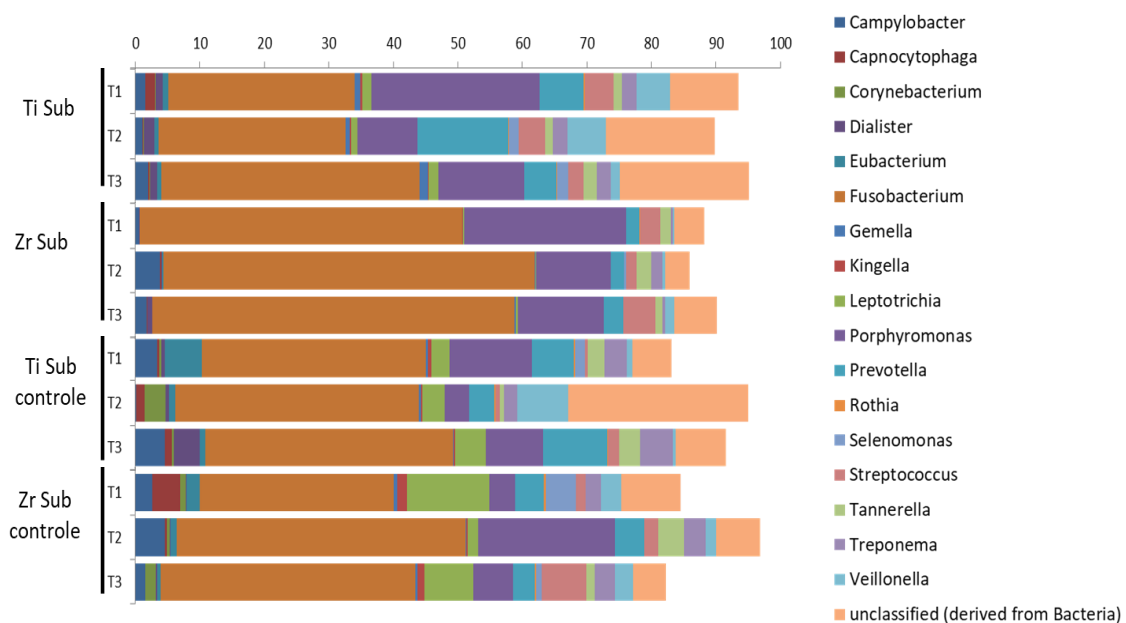
**Figura 20** – Abundância relativa da distribuição filogenética das amostras supra e subgingivais associadas a implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle). A: biofilme supragengival titânio; B: biofilme supragengival zircônia; C: biofilme submucoso titânio; D: biofilme submucoso zircônia; E: biofilme supragengival dente contralateral titânio; F: biofilme supragengival dente contralateral zircônia; G: biofilme subgingival dente contralateral titânio; H: biofilme subgingival dente contralateral zircônia; T1: 1 ano após instalação da prótese; T2: 2 anos após instalação da prótese e T3: 3 anos após instalação da prótese.



**Figura 21** – Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras supragengivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle). Supra: biofilme supragengival; Ti: titânio; Zr: zircônia; T1: 1 ano após instalação da prótese; T2: 2 anos após instalação da prótese e T3: 3 anos após instalação da prótese.



**Figura 22** – Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras subgengivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle). Sub: biofilme submucoso/subgengival; Ti: titânio; Zr: zircônia; T1: 1 ano após instalação da prótese; T2: 2 anos após instalação da prótese e T3: 3 anos após instalação da prótese.



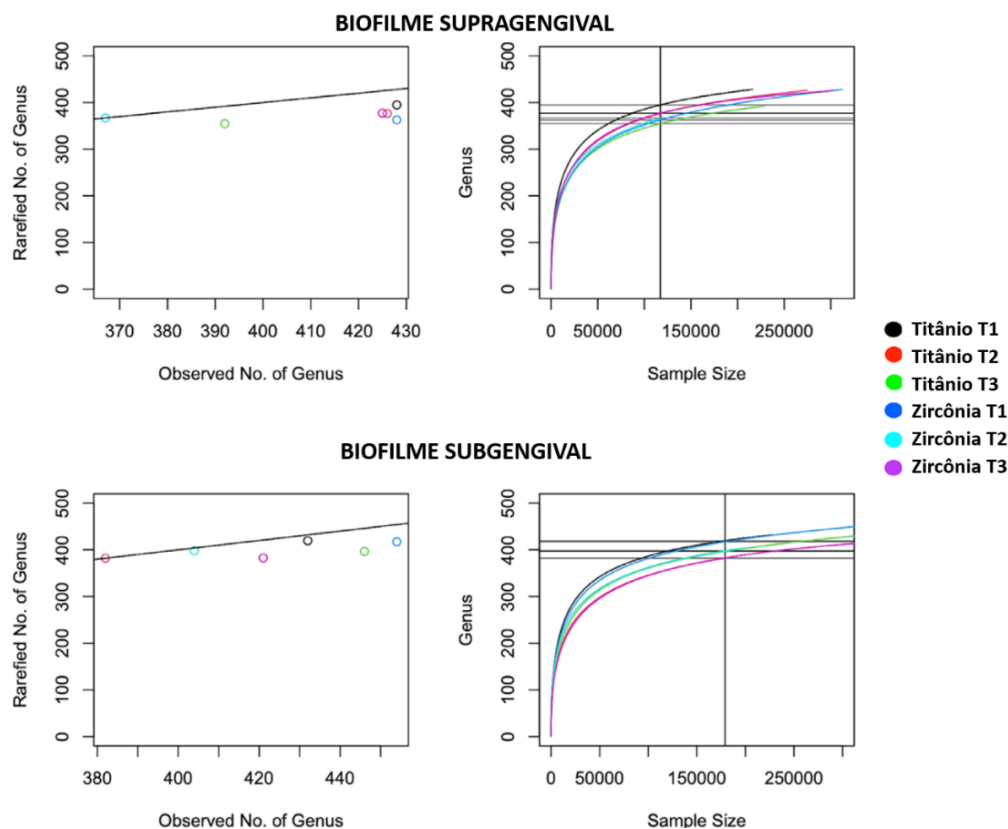
**Tabela 7.** Contagens de OTU e diferentes índices de diversidade de bactérias nas amostras de biofilme. T1: 1 ano após instalação da prótese; T2: 2 anos após instalação da prótese e T3: 3 anos após instalação da prótese.

Sítios coletados	ÍNDICE						
	Nº de OTUs	Riqueza (S)	Riqueza de Margalef	Shannon (H' )	Simpson	Chao1	ACE
<b>SUPRAGENGIVAL</b>							
Titânio (T1)	216 077	428	49.24	3.16	0.9076	470.50	459.97
Titânio (T2)	274 586	426	48.16	3.15	0.8921	485.11	459.98
Titânio (T3)	228 478	392	47.12	2.50	0.7756	439.51	429.21
Zircônia I (T1)	312 585	428	49.21	2.49	0.7514	509.35	484.60
Zircônia (T2)	117 184	367	46.32	2.88	0.8448	465.30	431.84
Zircônia (T3)	301 861	425	48.67	3.17	0.9005	445.02	446.43
Titânio dente contralateral (T1)	266 891	429	50.22	3.35	0.9296	490.03	474.12
Titânio dente contralateral (T2)	395 858	437	52.33	3.17	0.8887	457.02	461.07
Titânio dente contralateral (T3)	469 491	450	59.67	3.28	0.9056	519.39	490.53
Zircônia dente contralateral (T1)	542 025	436	52.11	3.19	0.9062	468.25	464.84
Zircônia dente contralateral (T2)	95 957	416	48.76	2.29	0.7774	473.60	468.46
Zircônia dente contralateral (T3)	291 908	365	45.97	3.06	0.8625	452.12	428.02
<b>SUBGENGIVAL</b>							
Titânio (T1)	179 024	432	50.67	3.27	0.9158	474.50	467.80
Titânio (T2)	407 875	382	47.23	3.23	0.9143	424.38	425.60
Titânio (T3)	227 726	446	58.57	3.32	0.9281	515.75	495.26
Zircônia I (T1)	365 752	454	60.19	3.51	0.9427	517.37	496.25
Zircônia (T2)	199 539	404	47.98	3.46	0.9437	438.07	444.86
Zircônia (T3)	336 973	421	49.68	2.97	0.8784	457.03	449.62
Titânio dente contralateral (T1)	314 367	433	51.79	3.63	0.9359	477.71	466.29
Titânio dente contralateral (T2)	137 403	459	60.34	3.57	0.9419	516.18	503.92
Titânio dente contralateral (T3)	509 321	456	60.17	3.30	0.9267	493.12	493.74
Zircônia dente contralateral (T1)	363 394	431	50.14	3.18	0.9135	461.44	460.61
Zircônia dente contralateral (T2)	364 768	395	49.03	3.35	0.9332	422.77	420.77
Zircônia dente contralateral (T3)	231 869	441	49.89	3.47	0.9417	473.62	466.85

A riqueza microbiana, caracterizada pelo número de micro-organismos presentes nas comunidades investigadas, variou entre 365 (no biofilme supragengival de dentes contralaterais do grupo zircônia em T3) e 459 (no biofilme subgengival de dentes contralaterais do grupo

titânio em T2); O índice de Margalef confirmou esses resultados com os seguintes valores 45,97 (menor diversidade) e 60,34 (maior diversidade). Amostras submucosas do grupo titânio apresentaram maior número de espécies quando comparadas ao grupo zircônia. No entanto, o inverso foi observado para amostras supragengivais, com as contagens mais altas de espécies relatadas para o grupo de zircônia. Como a medição da riqueza é afetada pelo tamanho da amostra, curvas de rarefação foram obtidas para padronizar todas as amostras investigadas em um número comum de sequências. A rarefação confirmou as diferenças observadas no padrão de riqueza dos grupos titânio e zircônia. Além disso, as comunidades de biofilmes supragengival e subgengival dos dentes contralaterais, para ambos os grupos (titânio e zircônia), foram mais diversas que os diferentes materiais de conector protético ( $p < 2 \times 10^{-16}$ ; ANOVA seguida por HSD de Tukey - Figura 23)

**Figura 23.** Curva de rarefação calculadas com base nos gêneros observados e nos dados de riqueza microbiana das comunidades de ambos os substratos investigados, titânio e zircônia.



O índice de diversidade de Shannon, que mede a riqueza e a uniformidade das comunidades em uma amostra, variou entre 2,88 e 3,58, indicando alta diversidade alfa para a maioria das amostras. O índice de Shannon de amostras subgingivais / submucosas do grupo titânio também apresentou os maiores valores quando comparados à zircônia. O índice de Simpson, que nos indica a dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos, escolhidos ao acaso na comunidade, pertencerem à mesma espécie, variou de 0,75 a 0,94, com valor médio de 0,94. Um padrão semelhante foi observado para os índices de diversidade de Shannon e Simpson, mas a magnitude da mudança diferiu para cada índice.

Os índices Chao1 e ACE, estimadores de riqueza, apresentaram padrão semelhante e diferenças entre os substratos. Chao1 variou de 422,77 (biofilme subgingival de dentes contralaterais do grupo zircônia em T2) a 519,39 (biofilme supragengival de dentes contralaterais do grupo titânio em T3) e ACE variou de 420,77 (biofilme subgingival de dentes contralaterais do grupo zircônia em T2) a 503,92 (biofilme subgingival de dentes contralaterais do grupo titânio em T2). A riqueza e diversidade de espécies diferiram significativamente entre os substratos. As diferenças mínimas significativas estão exibidas na Tabela 8. No entanto, nenhuma associação foi observada entre o tempo de amostragem e os valores de diversidade alfa avaliados por regressão linear ( $p > 0,05$ ). O tempo não afetou os índices de diversidade das comunidades.

**Tabela 8.** Diferenças significativas entre os substratos de titânio e zircônia (ANOVA followed by Tukey's HSD).

Sítios coletados	ÍNDICE							
	Nº de OTUs	Richness (S)	Riqueza de Margalef	Shannon (H' )	Simpson	Chao1	ACE	
<b>SUPRAGENGIVAL</b>								
Implante								
	(T1)	***	**	**	NS	NS	**	**
	(T2)	***	**	**	NS	NS	**	**
	(T3)	***	NS	NS	*	*	**	*
Dente contralateral								
	(T1)	***	**	**	*	*	*	**
	(T2)	***	**	**	*	*	*	*
	(T3)	NS	**	**	*	*	NS	NS
<b>SUBGENGIVAL</b>								
Implante								
	(T1)	**	**	**	**	**	*	**
	(T2)	**	**	**	**	**	*	**
	(T3)	**	**	**	**	**	*	**

Dente contralateral								
(T1)	***	**	**	*	**	*	**	
(T2)	***	**	**	*	*	*	**	
(T3)	***	**	**	NS	*	*	**	

\* $p < .05$ .

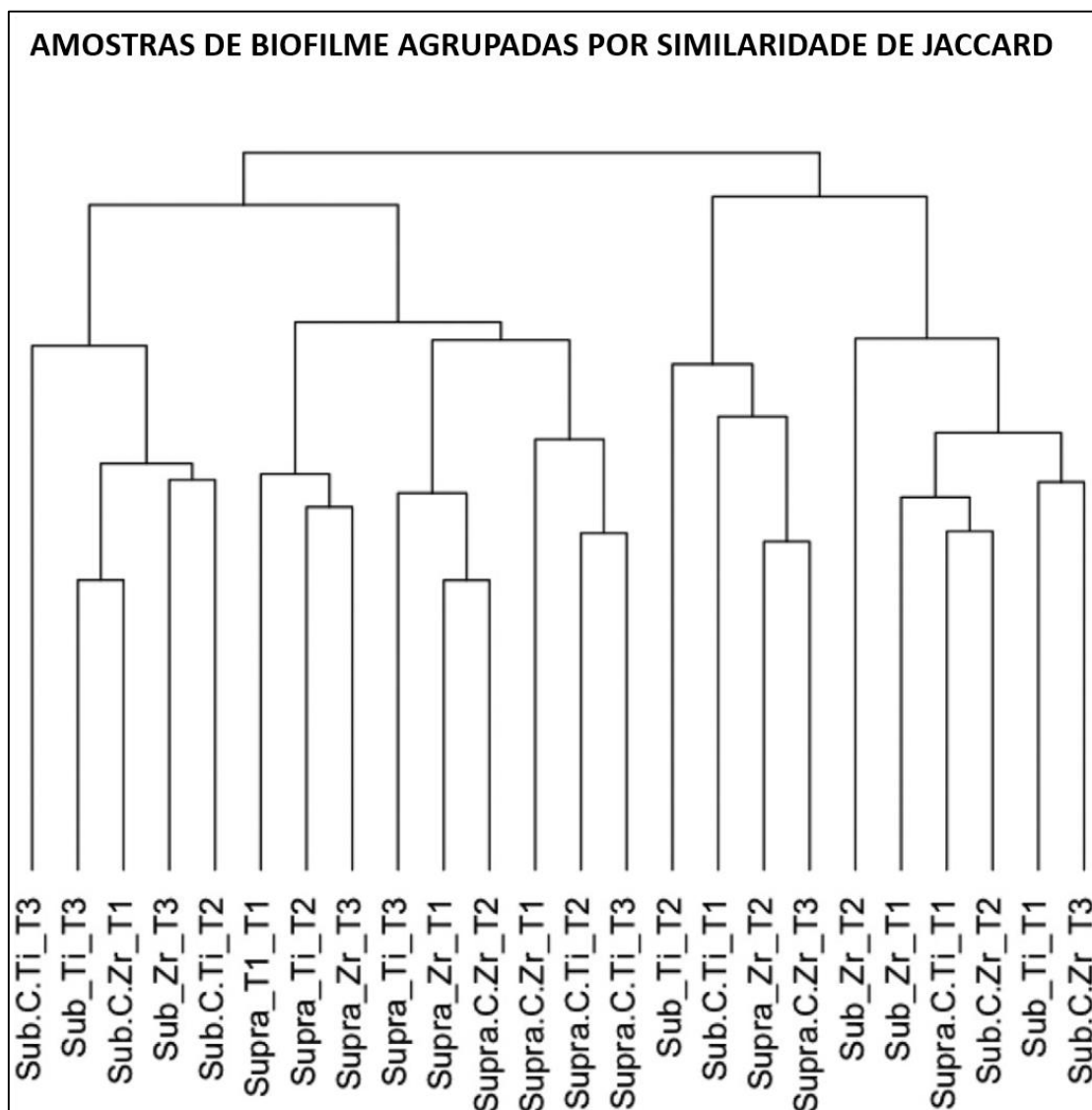
\*\* $p < .01$ .

\*\*\* $p < .001$ .

Abreviações: HSD, Diferença Honestamente Significante; NS, sem diferença.

A Figura 24 ilustra a similaridade das comunidades medida por meio do Coeficiente de similaridade de Jaccard. Esse índice resume o quanto dois conjuntos de espécies se sobrepõem, e é obtido por meio da razão entre o número de espécies compartilhadas entre as duas comunidades e o número total de espécies em ambos. O Jaccard não leva em consideração a abundância de OTUs, mas depende da presença / ausência de OTUs. Como esperado, os maiores valores de similaridade foram observados comparando amostras de dentes contralaterais de ambos os grupos (81%). Os valores de similaridade para amostras submucosas de titânio e zircônia foram 62% em T1, 68% em T2 e 45% em T3. Para amostras supragengivais, os valores de similaridade foram 62% em T1, 57% em T2 e 51% em T3. No geral, a semelhança da microbiota dos conectores de titânio e zircônia reduziu ao longo do tempo e difere cerca de 50% após 3 anos de carregamento funcional. O titânio apresentou alta similaridade de microbiota com os dentes contralaterais em T1 (60% para biofilme supragengival e 62% para biofilmes subgengivais / submucosos). A semelhança da microbiota de titânio e seus dentes contralaterais diminuíram ao longo do tempo para o biofilme submucoso. O tempo impactou de forma mais eficaz na microbiota submucosa. Os valores em T3 foram 62% e 45%, respectivamente, para biofilmes supragengival e submucoso. Por outro lado, a microbiota supragengival da zircônia foi significativamente diferente dos dentes contralaterais durante todo o tempo experimental (49% em T1 e 56% em T3). Diferentemente, a similaridade da microbiota subgengival/submucosa foi alta em T1 (76%), permanecendo com valores semelhantes em T3 (62%).

**Figura 24.** Dendrograma de similaridade de comunidades obtido pelo coeficiente de correlação de Jaccard  
C = dentes contralaterais; Sub = biofilme subgingival/submucoso; Supra = biofilme supragingival; T1 = 1 ano;  
T2 = 2 anos; T3 = 3 anos; Ti = conector de titânio; Zr = conector de zircônia.

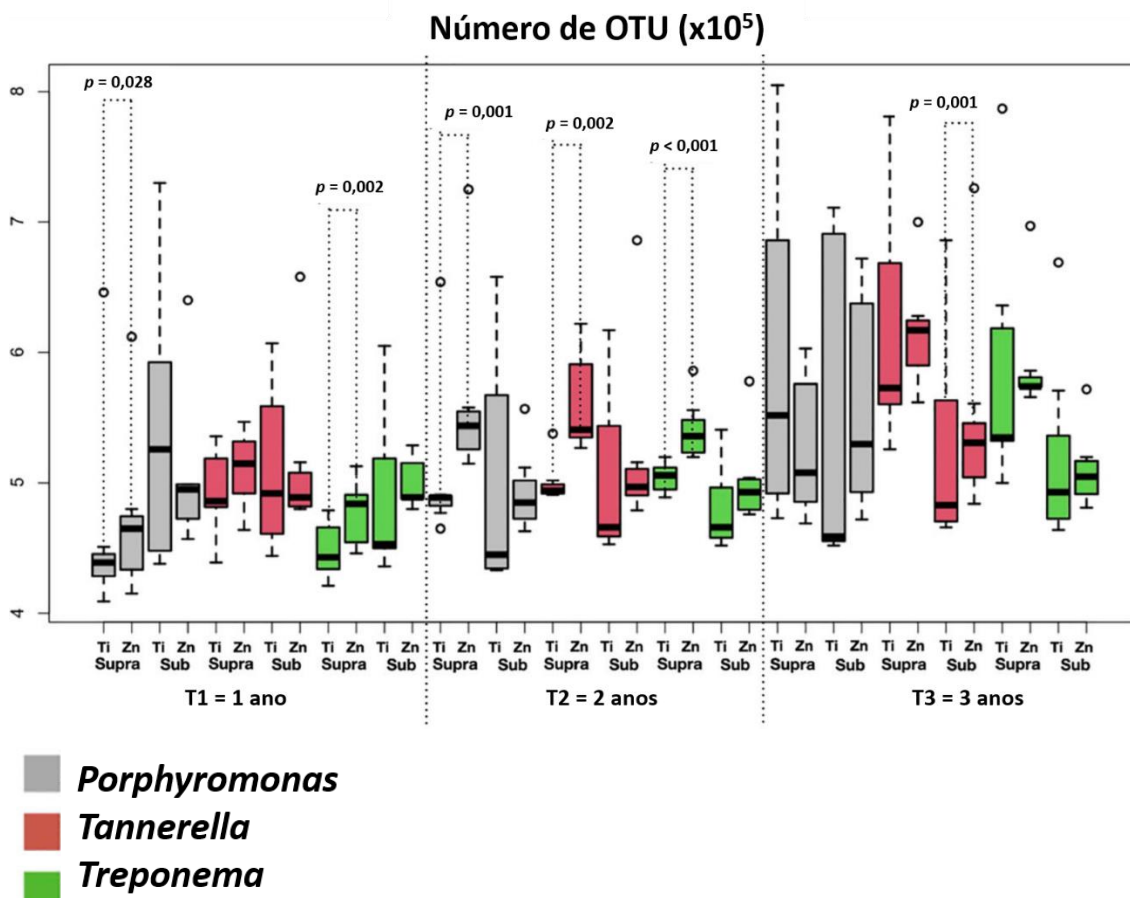


#### 4.2.6. Avaliação de patógenos periodontais

As análises estatísticas *Wald-Type Statistic* (WTS) e *ANOVA-Type Statistic* (ATS) propostas por Brunner e Langer (BRUNNER & LANGER, 1999) mostraram diferenças significativas na contagem de bactérias entre os grupos ao longo de 3 anos de carga funcional. No geral, as contagens bacterianas de biofilmes supragingival e subgingival/submucoso aumentaram após 3 anos para ambos os substratos. Os valores de  $p$  foram 0,0502 e 0,0001 para

WTS e ATS, respectivamente. As comparações entre os conectores mostraram diferenças significativas para *Porphyromonas* no biofilme supragengival em T0 ( $p = 0,028$ ) e em T2 ( $p = 0,001$ ); *Tannerella* no biofilme supragengival em T2 ( $p = 0,002$ ) e biofilme submucoso em T3 ( $p = 0,001$ ); e *Treponema* no biofilme supragengival em T2 ( $p < 0,001$ ). Em todas as comparações, as contagens mais altas foram registradas para as amostras associadas aos conectores de zircônia. A Figura 25 ilustra os gráficos tipo *Box Plot* com a representação dos valores mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e valores máximos de contagens de OTU medidas para cada ponto de tempo separadamente. Eles indicam que as distâncias medidas têm uma distribuição um tanto enviesada. O aumento da mediana dá origem a um efeito de tempo nessas espécies selecionadas.

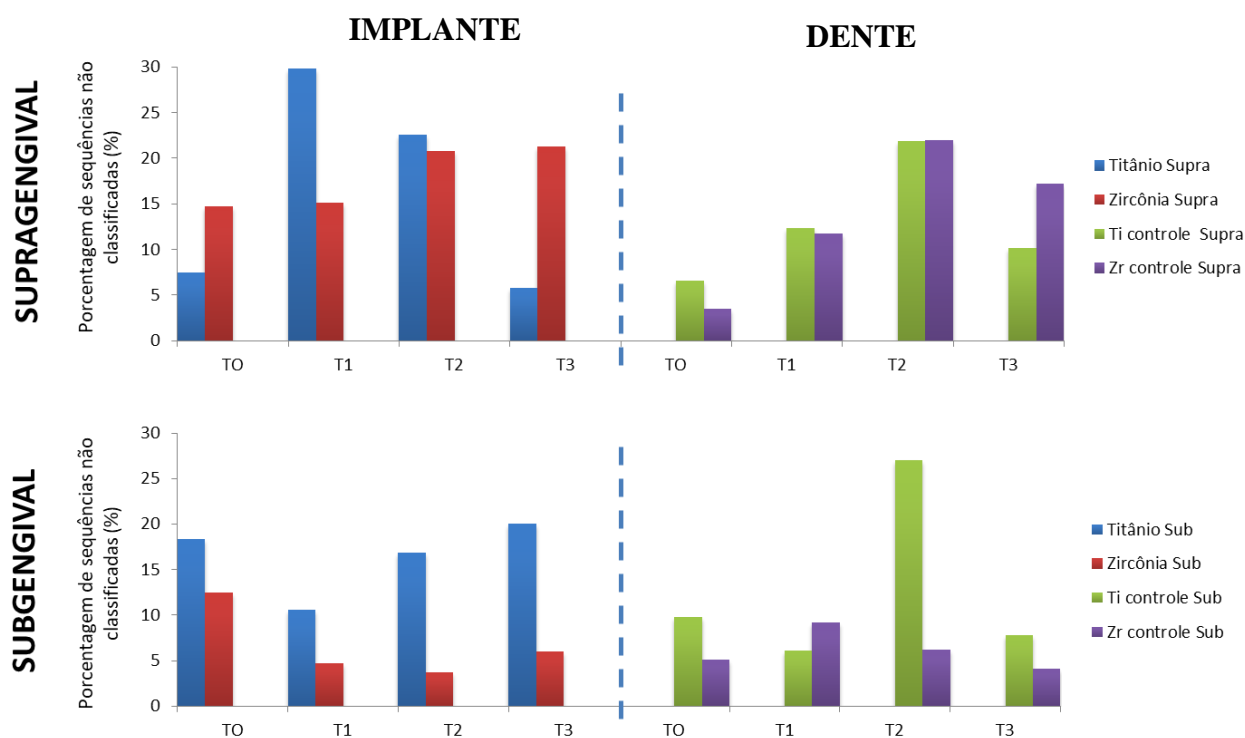
**Figura 25.** Mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo de contagens de OTU ( $\times 10^5$ ) de patógenos periodontais detectados nos biofilmes supragengivais e submucosos de implantes locais (titânio e zircônia) ao longo do tempo. Sub = biofilme subgengival/submucoso; Supra = biofilme supragengival; T1 = 1 ano; T2 = 2 anos; T3 = 3 anos; Ti = conector de titânio; Zr = conector de zircônia.





A Figura 26 ilustra a porcentagem de leituras de seqüências das espécies bacterianas enquadradas como “não classificadas”, em amostras supra ou subgingival relacionadas com implantes ou dentes. As amostras sub e supragengivais dos grupos controles apresentaram porcentagens semelhantes de seqüências “não classificadas” em praticamente todos os tempos investigados. Diferentemente, nas amostras relacionadas aos implantes, maiores porcentagens de seqüências “não classificadas” foram encontradas em amostras associadas aos conectores de titânio, tanto no biofilme supragengival (29,85% no tempo T1) quanto no biofilme submucoso (20,02% no tempo T3). A porcentagem média para todos os tempos investigados nas amostras subgingivais foi de 16,44% para o grupo titânio e 6,69% para o grupo zircônia.

**Figura 26** – Porcentagem de seqüências “não classificadas” em amostras supra e subgingivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contralaterais (controle). T0= baseline; T1= 1 ano após instalação da prótese; T2= 2 anos após instalação da prótese e T3 = 3 anos após instalação da prótese.



### 4.3. Indicadores clínicos

Todos os implantes estavam osseointegrados e sem presença de mobilidade após 36 meses de função. Nenhum sinal clínico de complicação (infecção local, inchaço, fístula ou mucosite peri-implantar) foi identificado em todos períodos avaliados, resultando em taxa de sucesso de 100% para os implantes em ambos os grupos. Foram avaliados um total de 744 sítios relacionados aos implantes e dentes contralaterais nos tempos investigados. A Tabela 9 contém a média e desvio-padrão dos parâmetros clínicos profundidade de sondagem, recessão gengival e sangramento à sondagem dos sítios associados aos implantes e dentes contralaterais investigados ao longo do tempo.

#### 4.3.1. Profundidade de sondagem

Os valores de profundidade de sondagem média (mm,  $\pm$  DP) após inserção do conector protético (T0), 12 meses (T1), 24 meses (T2) e 36 meses (T3) de função foram, respectivamente, 1,80 (1,55), 3,52 (1,72), 2,78 (1,30) e 2,66 (1,25) para titânio; e 3,01 (1,68), 2,53 (0,69), 2,72 (0,81) e 2,16 (0,81) para a zircônia (Tabela 9). A profundidade de sondagem aumentou significativamente durante o primeiro ano de carregamento nos sítios restaurados com implante e conector de titânio, mas não houve diferença comparando-se os tempos T1, T2 e T3, ou seja, apesar do aumento na profundidade de sondagem com um ano de carga, os valores mantiveram-se constantes até 36 meses de função. Enquanto nos sítios associados aos conectores de zircônia permaneceu inalterada no mesmo período. A análise por múltiplas comparações também revelou variação significativa entre os grupos titânio e zircônia até o período de 12 meses. Após esse período, não houve diferença significativa entre os grupos. Os dentes contralaterais mantiveram a profundidade de sondagem constante ao longo dos 36 meses de investigação em ambos os grupos. A figura 27 ilustra o efeito relativo dos conectores de titânio, zircônia e respectivos dentes contralaterais (controle) no sangramento à sondagem ao longo dos tempos investigados (T0, T1, T2 e T3).

**Tabela 9** – Média e desvio padrão ( $\pm$  DP) dos indicadores clínicos dos sítios periodontais e peri-implantares dos indivíduos reabilitados com conectores protéticos de zircônia ou titânio ao longo do tempo.

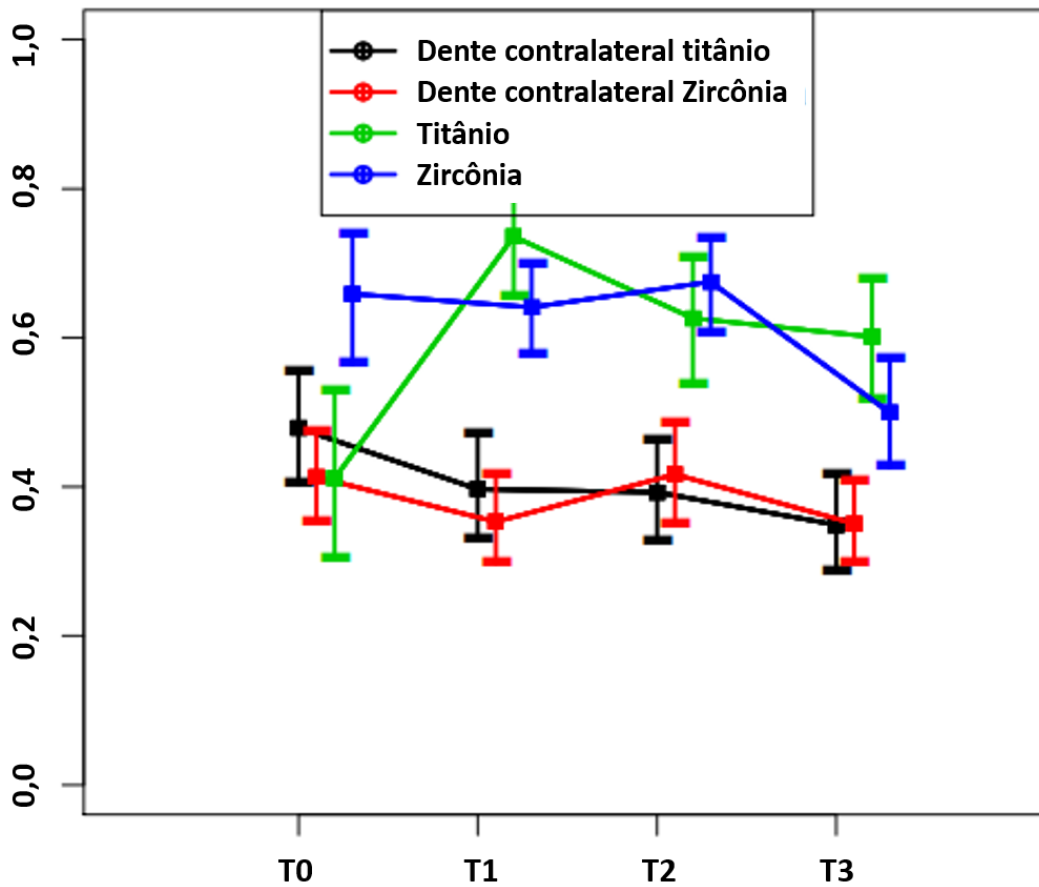
TITÂNIO								
	Implante				Dente contralateral			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
<b>Profundidade de sondagem</b> (mm, média $\pm$ DP)	1,80 $\pm$ 1,55** <sup>A</sup>	3,52 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	2,78 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	2,66 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,70 <sup>*B</sup>	1,85 $\pm$ 0,67 <sup>*b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

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

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

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

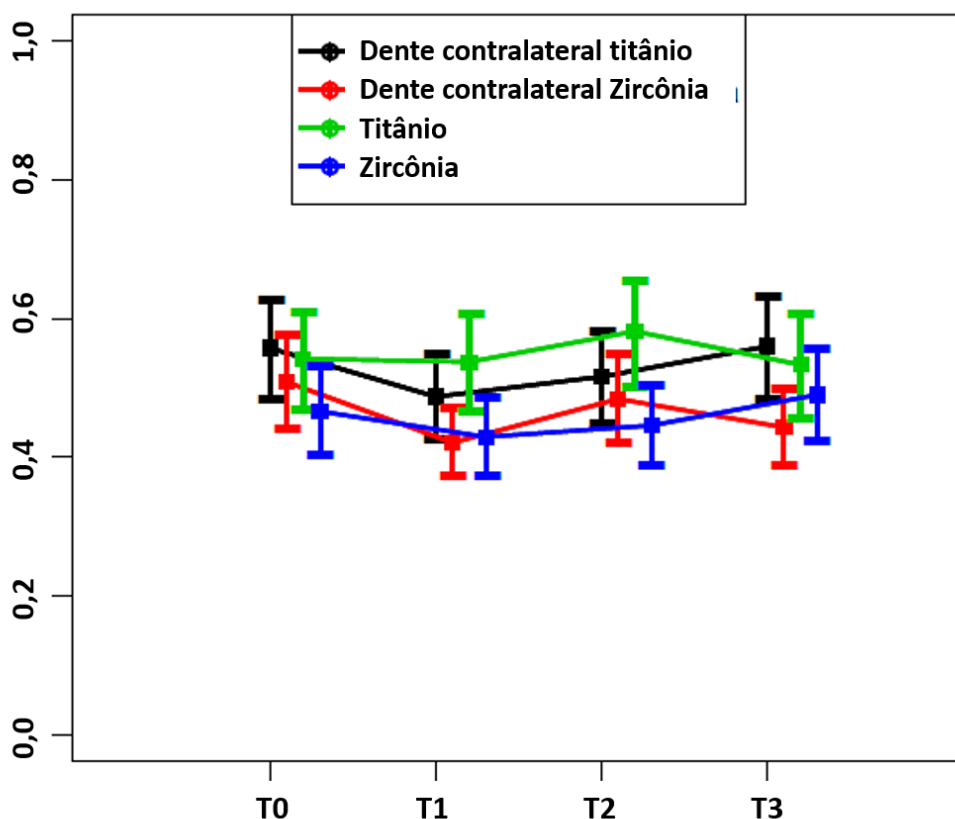
**Figura 27.** Efeito relativo dos fatores substrato e tempo na profundidade de sondagem. T0: *baseline*; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.



#### 4.3.2. Recessão gengival

No geral, houve aumento da recessão gengival ao longo do tempo para ambos os substratos investigados. Os valores de recessão gengival (mm,  $\pm$  desvio padrão) foram de  $0,13 \pm 0,27$  (T0),  $0,25 \pm 0,50$  (T1),  $0,45 \pm 0,70$  (T2) e  $0,45 \pm 0,79$  (T3) nos sítios associados aos implantes restaurados com conectores de titânio, e  $0,18 \pm 0,61$  (T0),  $0,21 \pm 0,70$  (T1),  $0,18 \pm 0,60$  (T2) e  $0,34 \pm 0,85$  (T3) nos sítios associados aos conectores de zircônia. Apesar do aumento ao longo do tempo investigado, não foi observado diferenças na recessão gengival entre os sítios com conectores de zircônia ou titânio. Além disso, a recessão gengival nos sítios com implantes foi semelhante ao observado nos dentes contralaterais (Tabela 9). A figura 28 ilustra o efeito relativo dos conectores de titânio, zircônia e respectivos dentes contralaterais (controle) na recessão gengival ao longo dos tempos investigados (T0, T1, T2 e T3).

**Figura 28.** Efeito relativo dos fatores substrato e tempo na recessão gengival. T0: *baseline*; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.

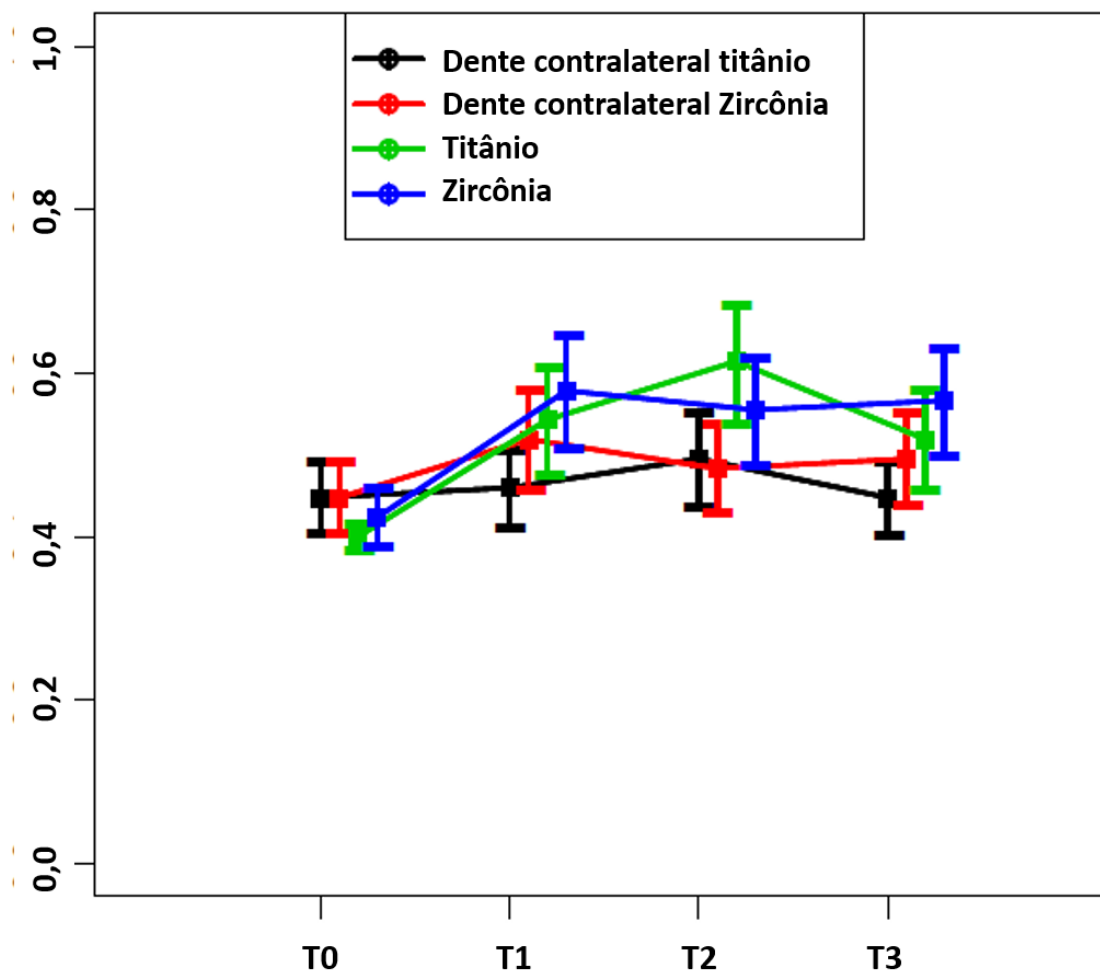


#### 4.3.3. Sangramento à sondagem

O sangramento na sondagem aumentou ao longo do tempo para ambos os substratos investigados. O sangramento na sondagem (%) foi de 1,70 (T0), 28,60 (T1), 42,90 (T2) e 23,80 (T3) para titânio; e 5,00 (linha de base), 35,70 (T1), 31,00 (T2) e 33,30 (T3) para zircônia. Não houve diferença significativa no sangramento à sondagem entre T1, T2 e T3 para os sítios associados aos implantes restaurados com conectores de zircônia, ou seja, após 12 meses de função o sangramento à sondagem permaneceu sem alterações no grupo zircônia. Enquanto isso, nos sítios com conectores de titânio, foi verificado maiores valores de sangramento à sondagem após 24 meses de função (T2), a partir desse período se observa leve redução (T3). Não houve diferença no sangramento à sondagem entre os grupos titânio e zircônia no momento de instalação dos conectores (T0), porém maiores valores de sangramento foram observados nos períodos T1 e T3 nos sítios associados aos conectores de zircônia. Assim como já observado para a profundidade de sondagem e recessão gengival, os dados dos grupos controles (dentes contralaterais) permanecem praticamente constantes ao longo do tempo. (Tabela 9). A figura

29 ilustra o efeito relativo dos conectores de titânio, zircônia e respectivos dentes contralaterais (controle) no sangramento à sondagem ao longo dos tempos investigados (T0, T1, T2 e T3).

**Figura 29.** Efeito relativo dos fatores substrato e tempo no sangramento à sondagem. T0: *baseline*; T1: 12 meses; T2: 24 meses; T3: 36 meses.



#### 4.3.4. Perda óssea marginal

A Tabela 10 mostra os dados de perda óssea marginal (mm, média  $\pm$  DP) para os conectores de zircônia e titânio ao longo dos tempos investigados. A influência do substrato na reabsorção óssea marginal foi avaliada por meio do teste *Two-Way* ANOVA. A perda óssea marginal total (mm,  $\pm$  SD) em torno do dente implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia após 3 anos foram  $0,99 \pm 0,41$  e  $0,76 \pm 0,21$ , respectivamente, sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

**Tabela 10** - Perda óssea marginal (mm, média  $\pm$  DP) ao redor dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia após 12, 24 e 36 meses de função.

	Reabsorção Óssea Marginal			Perda óssea total
	0 – 1 ano	1 – 2 anos	2 – 3 anos	
<b>Titânio</b>	0,39 $\pm$ 0,64	0,26 $\pm$ 0,32	0,34 $\pm$ 0,26	0,99 $\pm$ 0,41
<b>Zircônia</b>	0,30 $\pm$ 0,22	0,34 $\pm$ 0,33	0,12 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,21

#### 4.4. Parâmetros clínicos e correlação com achados microbiológicos

A correlação entre índices de diversidade e parâmetros clínicos em cada grupo foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson. No geral, o biofilme submucoso apresentou grandes correlações com os resultados clínicos. O grupo zircônia mostrou grandes correlações com a profundidade de sondagem e perda óssea, enquanto o titânio mostrou grandes correlações com sangramento à sondagem. A abundância relativa dos diferentes táxons (índices de Shannon e Simpson) e estimadores de riqueza (índices Chao1 e ACE) colocaram um peso maior na profundidade de sondagem, enquanto a riqueza impactou no sangramento na sondagem e na perda óssea. Sangramento à sondagem e perda óssea foram significativamente correlacionados no grupo de titânio com coeficiente de correlação de 0,7905 ( $p = 0,0128$ ). Nenhuma correlação foi encontrada entre o sangramento à sondagem e a profundidade de sondagem para os grupos titânio ou zircônia. A Tabela 11 mostra todos os coeficientes de correlação e respectivos valores de  $p$ .

Em relação aos patógenos bacterianos, as correlações foram encontradas da seguinte forma: o gênero *Tannerella* correlacionou-se com sangramento à sondagem no grupo titânio (valor de  $p$  0,0020, coeficiente 0,9940) e com profundidade de sondagem no grupo zircônia (valor de  $p$  0,0053, coeficiente 0,9624); o gênero *Treponema* se correlacionou com sangramento na sondagem no grupo zircônia (valor de  $p$  0,0124, coeficiente 0,9074); e o gênero *Porphyromonas* se correlacionou com a perda óssea no grupo zircônia (valor de  $p$  0,0475, coeficiente 0,7972).

**Tabela 11** - Teste de correlação de Pearson entre parâmetros clínicos e diversidade microbiana.

Sítios coletados	Profundidade de Sondagem Correlação		Sangramento à Sondagem Correlação		Perda Óssea Marginal Correlação	
	Coefficiente	Valor p	Coefficiente	Valor p	Coefficiente	Valor p
<b>SUBMUCOSO</b>						
Titânio						
Riqueza	0.1837	0.7274	0.9994	<0.0001*	0.8378	0.0372*
Índice Shannon	0.1929	0.7155	0.9415	0.0050*	0.5772	0.2303
Índice Simpson	0.5257	0.2841	0.7622	0.0780	0.2522	0.6296
Índice Chao1	0.0731	0.7850	0.9750	0.0009*	0.6708	0.1447
Índice ACE	0.0076	0.8089	0.9875	0.0002*	0.7180	0.1081
Zircônia						
Riqueza	0.8915	0.0170*	0.5814	0.2261	0.9432	0.0047*
Índice Shannon	0.6718	0.1439	0.6316	0.1785	0.0718	0.8924
Índice Simpson	0.5967	0.2112	0.7039	0.1185	0.1683	0.7498
Índice Chao1	0.9358	0.0060*	0.1299	0.6892	0.9011	0.0141*
Índice ACE	0.9773	0.0007*	0.3555	0.4891	0.8278	0.0418*
<b>SUPRAGENGIVAL</b>						
Titânio						
Riqueza	0.6459	0.1659	0.6579	0.1555	0.1061	0.8414
Índice Shannon	0.7083	0.1152	0.5917	0.2160	0.0214	0.9678
Índice Simpson	0.1299	0.6892	0.6130	0.1956	0.0481	0.9278
Índice Chao1	0.3275	0.5263	0.8850	0.0190*	0.4572	0.3619
Índice ACE	0.6071	0.2012	0.6945	0.1257	0.1554	0.7687
Zircônia						
Riqueza	0.4241	0.4019	0.9589	0.0024*	0.9479	0.0039*
Índice Shannon	0.9524	0.0033*	0.0988	0.7641	0.4372	0.3860
Índice Simpson	0.9690	0.0014*	0.0988	0.8522	0.4905	0.3232
Índice Chao1	0.9830	0.0004*	0.0337	0.9494	0.5463	0.2620
Índice ACE	0.4552	0.3643	0.9485	0.0039*	0.9583	0.0025*

\* $p < 0,05$



*Discussão*

---



## 5. DISCUSSÃO

Este estudo longitudinal prospectivo investigou, por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA, o perfil microbiano de biofilmes supragengivais e submucosos associados a restaurações unitárias de implantes cimentadas sobre conectores de titânio ou zircônia, e correlacionou com achados clínicos ao longo de 3 anos de carga funcional em indivíduos saudáveis. O objetivo foi comparar o biofilme formado desde a instalação das próteses até um período de 36 meses de função e avaliar seu impacto sobre indicadores clínicos de saúde dos tecidos de suporte peri-implantar, como profundidade e sangramento à sondagem, recessão gengival e reabsorção óssea marginal. De forma semelhante, este estudo investigou o biofilme supra e subgengival/submucoso e parâmetros clínicos associados aos dentes contralaterais. O perfil microbiano e a diversidade das espécies colonizando os sítios peri-implantares e dentes contralaterais foram descritos em detalhes. Após 3 anos de investigação, não foi observada nenhuma complicação clínica ou biológica em ambos os grupos. A ausência de dor, desconforto, infecção/inflamação na região peri-implantar, mobilidade e perda óssea ao redor dos implantes acima de 3 mm, associado a obtenção de estética satisfatória em todas as restaurações avaliadas, resultou em uma taxa de sucesso de 100% em ambos os grupos. Os valores de reabsorção óssea encontrados foram próximos aos valores médios reportados na literatura após o primeiro ano de função.

Embora alguns estudos tenham observado similaridades entre a microbiota associada a implantes e dentes remanescentes (BOTERO et al. 2005; SALVI et al. 2008; SCHAUMANN et al., 2014; STOKMAN et al., 2017), estudos recentes mostram que as características físico-químicas das superfícies dos substratos impactam significativamente na adesão e colonização bacteriana (HAO ET AL., 2018; SAHRMANN et al., 2020), de forma que os conectores de titânio e zircônia parecem apresentar diferenças no perfil microbiano do biofilme formado (DO NASCIMENTO et al., 2014; SILVA et al., 2020), no entanto, ainda há falta de resultados conclusivos, principalmente em longo prazo, sobre o comportamento do perfil microbiano do biofilme peri-implantar associados aos diferentes conectores testados e o impacto dessa colonização na saúde dos tecidos de suporte. Assim, uma compreensão mais completa das comunidades microbianas presentes em torno dos implantes restaurados com conectores de titânio ou zircônia e as mudanças potenciais que ocorrem ao longo do tempo é primordial para melhorar o controle do biofilme e a redução de doenças de peri-implantares, uma vez que essa é uma das principais causas de insucesso dos implantes (ALGHAMDI et al., 2020) e que o acúmulo de biofilme com o tempo predispõe a ocorrência de mucosite e peri-implantite

(SOLBIATI et al., 2018). A literatura relata que após 5 a 10 anos da instalação dos implantes mais de 30 % dos indivíduos apresentaram peri-implantite e de 60 % a 80 % apresentaram mucosite nos estágios iniciais (LINDHE; MEYLE, 2008; MOMBELLI et al. 2012; LEE et al., 2017; KORDBACHEH et al., 2019). Essas doenças resultam de desequilíbrio microbiano e, se não for controlado, podem progredir com reabsorção óssea e levar à perda do implante (SGOLASTRA et al., 2015; CARRASCO-GARCÍA et al., 2019), o que reforça a importância de compreender o perfil microbiano associados aos diferentes conectores protéticos e como esse biofilme pode afetar os parâmetros clínicos ao longo do tempo.

A primeira hipótese testada nesta investigação foi aceita, uma vez que os resultados revelaram diferenças relevantes entre os conectores de titânio e zircônia, onde a microbiota peri-implantar foi significativamente influenciada pelo tipo de material usado como conector. A análise estatística mostrou que a riqueza de espécies, diversidade de suas comunidades e o número de unidades taxonômicas operacionais (OTU) dependem diretamente do tipo de substrato utilizado. Os microbiomas dos dois conectores, de titânio e de zircônia, apresentaram elevada riqueza de espécies e altos níveis de diversidade tanto em biofilme supragengival quanto submucoso; mudanças microbianas ocorreram, mas os valores permaneceram elevados ao longo do tempo investigado. Estudos que avaliaram a microbiota peri-implantar por meio de sequenciamento relatam a presença de uma alta diversidade microbiana em implantes saudáveis e doentes (DABDOUB et al., 2013). Resultados semelhantes foram encontrados nesse estudo, uma vez que foi identificado a presença de até 589 gêneros bacterianos diferentes, com média nos diferentes grupos de 505 gêneros.

As amostras de biofilme supragengival e submucoso de ambos substratos mostraram aumento de similaridade das comunidades ao longo do tempo de investigação, atingindo valores próximos a 70% após 3 anos. Este resultado nos sugere que a superfície do substrato pode ter maior impacto sobre o deslocamento bacteriano durante os primeiros anos de carga funcional, o que é benéfico para o prognóstico, visto que a literatura relata que leva aproximadamente 5 anos para a peri-implantite progredir e resultar em complicações clínicas (SOCRANSKY et al., 1998). A alta diversidade microbiana (589 gêneros) associada aos níveis de similaridade entre os substratos investigados são muito relevantes, uma vez que demonstram uma colonização microbiana diferente entre os conectores de titânio e zircônia, o que pode estar associado às características físicas e químicas das superfícies (LINKEVICIUS et al., 2015). Diversos estudos observaram elevada semelhança entre a microbiota dos dentes circundantes e a microbiota associada aos implantes dentários (SOLBIATI et al., 2018; OH et al., 2018), no entanto, nossos resultados mostraram que baixos valores de similaridade do microbioma entre os dentes

colaterais e os conectores de titânio e zircônia após 3 anos de investigação, variando entre 45% (amostras submucosas/subgingivais associadas aos conectores de titânio e dentes contralaterais) e 62% (amostras submucosas/subgingivais associadas aos conectores de titânio e dentes contralaterais). Estudos recentes corroboram com nossos resultados, onde observaram que microbiomas peri-implantar e periodontais apresentam ecossistemas microbiologicamente distintos e a proximidade do implante aos dentes não necessariamente resulta em uma colonização microbiana semelhante (DABDOUB et al., 2013; SAHRMANN et al., 2020). É provável que essa diferença de resultados esteja relacionada ao método de detecção, pois poucos estudos utilizaram o método de sequenciamento do gene rRNA 16S utilizado no presente estudo, que proporciona uma coleta de dados mais completa e detalhada e deveria ser implementado com mais frequência.

O uso de sequenciamento de alto rendimento independente de cultura de genes 16S rRNA facilitou muito os estudos que exploram as composições e dinâmicas microbianas associadas à saúde e às doenças, pois permite uma visão mais completa do perfil microbiano, diferente de técnicas dependentes de cultura ou de hibridização, e tem sido largamente utilizada para avaliar a diversidade microbiana em várias partes do corpo humano (XU et al., 2014, TSENG et al., 2016; KIM et al., 2017; BELSTROM et al., 2018). Estudos usando esta técnica de detecção revelaram uma vasta população de espécies ainda não-cultiváveis e/ou não-classificadas, assim como o presente estudo (FAURE et al., 2016; CORTÉS-ACHA et al., 2017; DE FREITAS et al., 2018). Estas espécies precisam ser monitoradas, pois podem estar associadas com a condição de desenvolvimento de doenças. Essa técnica tem proporcionado um importante avanço no conhecimento do microbioma humano, permitindo a obtenção de maiores detalhes referentes à taxonomia e função microbiana (Human Microbiome Project Consortium, 2012). É baseada em reação de PCR e pode apresentar alguns vieses, como especificidade e cobertura incompleta e incompatibilidade de *primers* utilizados (SIPOS et al., 2010; SCHLOSS et al., 2009; LEE et al., 2012), o que torna essa abordagem semi-quantitativa e pode superestimar a diversidade microbiana (KUNIN et al., 2010). No entanto, se realizarmos uma filtragem de qualidade e relativamente rigorosa com baixos limiares de agrupamento podemos garantir estimativas precisas da diversidade microbiana (KUNIN et al., 2010).

Seguindo as instruções do fabricante, os conectores de titânio foram instalados na região posterior de maxila/mandíbula e os conectores de zircônia foram instalados na região anterior de maxila. Como a alocação dos substratos não puderam ser randomizados, este estudo foi classificado como um desenho *quase-experimental*. Para amenizar o efeito dessa limitação, os conectores selecionados possuíam dimensões semelhantes e os dentes contralaterais foram

usados como controle para investigar possíveis diferenças no perfil microbiano das regiões anterior e posterior. Os resultados do nosso estudo mostraram similaridade geral de 82% (índice de similaridade de Jaccard) ao comparar a microbiota dos dentes contralaterais de ambos substratos, confirmando que a alocação dos conectores em diferentes regiões não influenciou o perfil microbiano. Alguns estudos sugerem que o substrato tem maior impacto na microbiota formada que a área de instalação dos implantes, o que corrobora com nossos resultados (HAHNEL et al., 2015; DE AVILA et al., 2014). Além disso, uma revisão sistemática publicada recente por Song e colaboradores (2020), após avaliarem o impacto da localização do implante na prevalência de peri-implantite, não observaram nenhuma diferença significativa entre a região anterior de maxila e posterior de mandíbula. Falhas na manutenção da higiene oral afetam significativamente o perfil da comunidade microbiana bucal (BELSTROM et al., 2018). Para minimizar a influência da higiene bucal na microbiota formada, no início do estudo, todos os participantes foram orientados a seguirem o mesmo protocolo de higienização, e durante todo o estudo foi reforçado a importância de manterem o protocolo e a forma correta de executá-lo. Assim, foi estabelecido que todos os participantes deveriam realizar escovação dentária três vezes ao dia, uso de fio dental e profilaxia em consultório a cada seis meses. Não foi observado infecção ou sinais de condições inflamatórias locais avançadas, durante todo o período de investigação, em nenhum dos 20 participantes do estudo. Além disso, a média de idade dos participantes em ambos os grupos foi semelhante, reduzindo potenciais vieses relacionados a esta característica (Titânio:  $48 \pm 3,6$ ; Zircônia:  $47 \pm 4,2$ ; anos de idade, média  $\pm$  DP).

A segunda hipótese do estudo, que o tempo de carga funcional afeta a comunidade microbiana associada aos conectores protéticos de titânio e zircônia, foi parcialmente rejeitada. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o tempo de carga funcional não afeta a diversidade microbiana, no entanto o tempo teve um efeito nas contagens de bactérias entre os grupos. Embora a regressão linear tenha produzido resultados não significativos do efeito do tempo na diversidade microbiana, isso pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra. Os índices Chao 1 e ACE obtidos sugerem que a diversidade diminuiu ao longo do tempo para amostras supragengivais de ambos os substratos. Esses índices não-paramétricos são indicadores de riqueza, eles estimam o número de OTUs esperadas com base em OTUs observadas (CHAO 1984; CHAO E LEE, 1992) e parecem ser mais sensíveis neste estudo, pois avaliaram a riqueza total de uma comunidade a partir de uma amostra. O índice de Chao 1 é baseado no conceito de que espécies raras inferem mais informações sobre o número de espécies desaparecidas, de forma que esse estimador dá mais peso aos táxons de baixa abundância (gêneros raros). No índice de riqueza ACE as sequências são agrupadas em raras e

abundantes de acordo com sua frequência de observação, se uma OTU apresenta a ocorrência de menos de 10 sequências do mesmo organismo, este então é considerado raro, acima de 10 sequências é considerado abundante, e a estimativa de táxons ausentes é baseada inteiramente nos táxons raros (HUGHES et al., 2001; KIM et al., 2017). Os conjuntos de dados obtidos no primeiro ano de avaliação se mostraram inclinados em direção aos gêneros de baixa abundância. Assim, nossos resultados sugerem que gêneros raros diminuem ao longo do tempo para os substratos de titânio e zircônia e podem não ter impacto nas complicações clínicas. No geral, diferente da diversidade, as contagens bacterianas aumentaram após 3 anos para ambos os substratos, mas também sem efeito significativo nos resultados clínicos.

Os índices de Shannon e Simpson nos permitem avaliar a diversidade da população microbiana em dada amostra, e nesses índices levam em consideração a riqueza e a abundância relativa das espécies (FERANCHUK et al., 2018). O índice de Shannon indica a diversidade de uma comunidade baseada em sua distribuição em dada amostra e no número de espécies encontradas na mesma. Assim, quanto maior o índice, maior o número de espécies retratadas e maior a diversidade. Por outro lado, o índice de Simpson reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie, e consiste em um valor que varia entre 0 e 1, quanto mais próximo a 0 menor a dominância e maior a diversidade. (SIMPSON, 1949). O índice de Simpson obtido nesse estudo confirmou que as comunidades não possuíam gêneros dominantes, o que reflete o equilíbrio da microbiota oral durante o período experimental. No geral, espécies periodontopatogênicas pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Tannerella* e *Treponema* foram encontrados em níveis baixos a moderados nos substratos de titânio e zircônia, com contagens relativamente altas para substrato de zircônia após 3 anos de carregamento. A presença dessas espécies em ambos os materiais pode sugerir que elas são patogênicas apenas quando o equilíbrio bacteriano é perturbado ou quando há suscetibilidade do hospedeiro, conforme proposto pela “teoria da placa ecológica”, na qual sugere que doenças mediadas por biofilme resultem de um desequilíbrio na microbiota, de um estado de simbiose para um de disbiose; e algumas espécies podem ser encontradas em baixos números na condição de saúde, mas podem se tornar patogênicas quando as condições recém estabelecidas os permitir (MARSH et al., 2017). Nossos resultados confirmam que os biofilmes podem abrigar tanto micro-organismos orais típicos quanto patógenos potenciais. De acordo com o observado na literatura, na maioria dos indivíduos periodontais saudáveis, o biofilme é composto por patógenos periodontais em quantidade semelhante ao encontrado em indivíduos com doença periodontal, ou seja, em níveis moderados a altos (KIM et al., 2017). No entanto, uma revisão sistemática recente, que avaliou o perfil microbiano peri-implantar, observou que

estudos que não utilizaram a técnica de sequenciamento / pirosequenciamento não encontraram diferenças substanciais e consistentes na prevalência de espécies microbianas específicas entre saúde e doença; no entanto, estudos que utilizaram a técnica molecular observaram uma maior prevalência de patógenos periodontais em implantes inflamados ou doentes (HAO et al., 2018).

Os resultados microbiológicos reportados sugerem uma colonização seletiva de algumas espécies bacterianas para cada tipo de substrato. Alguns fatores, tais como barreira gengival, topografia de superfície, interações atômicas (geralmente relacionadas ao potencial eletrostático de cada substrato) e energia livre superfície podem ajudar na compreensão destas diferenças (QUIRYNEN et al., 1995; HAO et al., 2018; ENGEL et al., 2020). A qualidade da união entre o tecido mole e o conector protético é um fator que merece destaque, pois pode desempenhar papel importante na redução da colonização microbiana, uma vez que essa união funciona como barreira mecânica para a passagem de micro-organismos à região peri-implantar e componentes dos implantes (NOTHDURFT et al., 2015; MAILOA et al., 2018). O epitélio gengival é a primeira linha de defesa contra a contaminação bacteriana em direção ao sulco peri-implantar (ABE-YUTORI et al., 2017). Estudos têm sugerido uma maior proliferação de fibroblastos e células epiteliais em superfícies de zircônia em relação ao titânio (YAMANO et al., 2011; NOTHDURFT et al., 2015), além disso, um estudo *in vitro* observou maior expressão de E-caderina em células epiteliais associadas à conectores de zircônia (OKABE et al., 2015). A expressão da E-caderina é essencial para manter a integridade estrutural do epitélio gengival, uma vez que ela desempenha um papel importante na adesão célula-célula na barreira epitelial (HORIGUCHI et al., 1994) e pode ser importante para o epitélio peri-implantar. Algumas bactérias periodonto-patogênicas podem destruir a barreira de proteção epitelial destruindo moléculas de adesão, como a E-caderina (NOGUCHI et al., 2003; ABE-YUTORI et al., 2017). Esses achados sugerem que a seletividade por determinadas espécies e diferenças no perfil microbiano observado em conectores de zircônia pode lhe conferir maior resistência a estímulos exógenos, por meio da manutenção de moléculas de adesão que confere fortes contatos intercelulares na barreira epitelial.

Espécies periodontopatogênicas, caracterizadas por sua capacidade destrutiva comparada com outras bactérias da microbiota oral, foram encontradas nas amostras de todos os grupos. No entanto, algumas espécies mostraram-se mais seletivas para determinado substrato, como *F. nucleatum* para zircônia e *P. gingivalis* para o titânio. *P. gingivalis* pode induzir mucosite peri-implantar e peri-implantite (YONG et al., 2015; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2016; AL-AHMAD et al., 2018) e *F. nucleatum*, que além de um patógeno necrosante relacionado à infecções peri-implantares (CANULLO et al., 2015) é também um patógeno que



se coagrega com muitas espécies, aumentando, assim, a formação do biofilme patogênico. Outro achado interessante do estudo, foi a detecção de uma abundância relativa significativa de espécies reportadas como “não classificadas”. Semelhante ao observado na primeira etapa deste estudo, a qual limitou-se a um período de avaliação de 6 meses, um maior percentual destas espécies bacterianas foi encontrado em amostras associadas aos conectores de titânio (DO NASCIMENTO et al., 2016). Alguns autores sugerem que rugosidade superficial é o fator que mais interfere na adesão microbiana em superfícies de titânio (LORENZETTI et al. 2015), enquanto outros estudos atribuíram a energia livre de superfície como fator mais importante na formação inicial do biofilme em superfícies de zircônia (HAHNEL et al. 2009; BURGERS et al. 2010). Diferenças na capacidade de adesão bacteriana têm sido atribuídas às diferenças de potenciais eletrostáticos entre os micro-organismos e substratos (YU et al. 2016). No entanto, ainda existem limitações no conhecimento sobre possíveis diferenças nos mecanismos de adesão bacteriana entre esses materiais, havendo, assim, a necessidade de uma melhor compreensão do papel do biofilme formado em cada componente na manutenção da saúde ou no desenvolvimento de potenciais lesões inflamatórias nos tecidos suportes peri-implantares, o que possibilitará o desenvolvimento de recomendações clínicas que possam evitar ou minimizar a proliferação dos micro-organismos, desenvolvimento de doenças e consequente perda dos implantes (YAMANO et al., 2011; NOTHDURFT et al., 2014).

Definir o conector protético mais apropriado e com melhor desempenho clínico ao longo do tempo, é um passo importante para um prognóstico favorável (TOTOU et al., 2021). Os conectores de titânio são utilizados há bastante tempo e têm demonstrado altas taxas de sobrevivência, excelente biocompatibilidade e alta resistência mecânica, no entanto, em biótipos mais finos, podem resultar em uma descoloração acinzentada da mucosa peri-implantar (BUSER et al., 2017), o que culminou no surgimento dos conectores cerâmicos, dentre eles, o mais utilizado, os conectores de zircônia (LINKEVICIUS et al., 2015). Algumas revisões sistemáticas foram realizadas com o objetivo de comparar o efeito dos conectores de titânio e zircônia sobre os tecidos moles peri-implantares, no entanto, de forma geral, não foram observadas diferenças significativas entre os conectores na manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares (LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015; SANZ-SÁNCHEZ et al., 2018; TOTOU et al., 2021). Nossos achados corroboram com esses resultados, pois nenhuma diferença significativa foi observada entre os conectores de titânio e zircônia após um ano de carga funcional, além disso, os dados obtidos foram compatíveis com condições de saúde dos tecidos de suporte peri-implantares. A literatura relata que acompanhar os parâmetros clínicos profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e perda óssea marginal é a forma mais

eficaz de identificar inflamação inicial da mucosa e progressão da doença peri-implantar (JEPSSEN et al., 2015). Como esperado, os dentes contralaterais mantiveram todos os parâmetros clínicos avaliados constantes durante toda investigação. Diferente do grupo zircônia, que manteve a profundidade de sondagem sem aumento ao longo de toda investigação, o grupo titânio apresentou aumento após 12 meses de carga, mas os valores se mantiveram constantes até o último período de investigação (36 meses) e dentro dos limites de profundidades dos sulcos peri-implantares preestabelecidos como normais, ou seja, inferior a 6 mm (RENVERT et al., 2018). O melhor desempenho dos conectores de zircônia na profundidade de sondagem no primeiro ano também foi observado em outros estudos (VAN BRAKEL et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016), e é possível que ocorra em decorrência da melhor adesão de células epiteliais nas superfícies polidas de zircônia em comparação com às superfícies de titânio, como observado em um estudo *in vitro* de Nothdurft e colaboradores (2015).

A presença de inflamação na mucosa ao redor do implante é denominada de mucosite, sendo observada quando há sangramento e/ou supuração após delicada sondagem (< 0,25 N) e ausência de aumento na profundidade de sondagem ou perda óssea acima de 3 mm (SALVI; LANG, 2004; REVERT et al., 2018). A literatura relata elevada prevalência de mucosite em pacientes reabilitados com implantes dentários, com taxas variando entre 64,6 % e 80% (FERREIRA et al., 2006; ZITZMANN; BERGLUNDH, 2008; LINDHE; MEYLE, 2008). Os resultados desse estudo mostraram aumento no sangramento à sondagem após 12 meses de função em ambos conectores, mas não houve avanço para condição de doença peri-implantar. Os valores mensurados após 12 meses de função variaram entre 23,8% e 42,9% no grupo titânio e 31,0 % e 35,7 % no grupo zircônia. Os valores estiveram de acordo com o observado na literatura, mesmo no tempo com maior percentual de sangramento à sondagem (T1 no grupo zircônia e T2 no grupo titânio), e não houve diferença nos valores de sangramento à sondagem nos sítios associados aos conectores de titânio ou zircônia e os dentes contralaterais. As próteses utilizadas nesse estudo foram cimentadas, e alguns estudos observaram maiores complicações biológicas, incluindo índice de placa e sangramento à sondagem, em próteses cimentadas em relação às próteses retidas por parafuso. Os autores justificam esse resultado a presença da linha de cimentação e solubilidade do cimento, o que pode favorecer o acúmulo de biofilme e causar inflamação local (WEBER et al., 2006; SAILE et al., 2012). No entanto, um estudo clínico prospectivo acompanhou o desempenho clínico de coroas unitárias cimentadas ou parafusadas sobre conectores protéticos de zircônia durante 10 anos, e ambos grupos apresentaram mucosite sem diferença significativa, além disso, não houve perda de implante e não observaram

diferenças em complicações biológicas ou estéticas entre os diferentes materiais (AMORFINI et al., 2018), logo próteses cimentadas com adequado controle na etapa de cimentação, para não deixar excesso de cimento, parece levar a um desempenho clínico semelhante às próteses parafusadas (KORSCH; ROBRA; WALTHER, 2015). Embora um protocolo de higiene oral tenha sido estabelecido no início do estudo e realizado um acompanhamento e reforço da técnica ao longo da investigação, uma possível explicação para presença de sangramento à sondagem observada em ambos os grupos está em falhas na higiene oral, uma vez que o acúmulo de biofilme pode causar inflamação local (BELSTROM et al., 2018).

Diversos estudos clínicos observaram a ocorrência de recessão gengival inferior a 1 mm nos sítios peri-implantares após 6 meses de instalação da prótese (BENGAZI; WENNSTROM; LEKHOLM, 1996; SMALL; TARNOW, 2000; CHANG; WENNSTROM, 2010). Resultados semelhantes foram observados em nosso estudo, onde houve um aumento da recessão gengival ao longo do tempo investigado em ambos os grupos, no entanto com valores máximos inferiores ao relatado na literatura (Titânio:  $0,42 \pm 0,79$  mm; Zircônia:  $0,34 \pm 0,85$  mm; após 36 meses de função; média  $\pm$  DP). Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de recessão gengival entre os conectores de titânio e zircônia e os respectivos dentes contralaterais. Alguns fatores podem ter influenciado a presença de recessão gengival nos grupos investigados, incluindo a espessura da mucosa fina ou pouco queratinizada, o mal posicionamento dos implantes e a remodelação da crista óssea que ocorre nos primeiros meses de função (FICKL, 2015). Além disso, segundo uma revisão sistemática realizada por Bidra e colaboradores (2013), após avaliarem o desempenho clínico de conectores de titânio e zircônia na região anterior, observaram maior recessão gengival em conectores pré-fabricados em relação aos conectores personalizados, por fornecerem menor suporte aos tecidos periodontais, o que pode justificar a recessão observada em nosso estudo, uma vez que ambos os conectores utilizados eram pré-fabricados. Semelhante aos nossos resultados, alguns estudos clínicos não observaram diferença significativa na recessão gengival entre os conectores de titânio e zircônia (CARRILLO DE ALBORNOZ et al., 2014; LOPS et al., 2015).

A perda óssea peri-implantar é um parâmetro clínico importante, pois associada a outros fatores e acima de 3 mm pode indicar a presença de peri-implantite, uma das principais causas de perda tardia dos implantes (RENVERT et al., 2018). A perda óssea por estar relacionada a diversos fatores, incluindo a técnica cirúrgica, posicionamento dos implantes, espessura da mucosa e tipo de conexão implante/conector (MAZZOCCO et al., 2017; CANEVA et al., 2010; AMO et al., 2016). Nesse estudo, os dados obtidos de perda óssea marginal não mostraram diferenças significantes entre os conectores de titânio e zircônia após 36 meses de investigação,

com perda óssea total inferior a 1 mm. Os resultados do nosso estudo mostraram valores inferiores ao reportado na literatura. Durante o primeiro ano de função dos implantes saudáveis, a literatura relata que ocorre perda óssea variando em torno de 0,17 a 0,9 mm, e superior a 1 mm após 3 anos de função (MANGANO et al., 2010; PIERI et al., 2011; CASSETA et al., 2016; PESSOA et al., 2017; SALEH et al., 2018). Um estudo realizado por Fuchigami e colaboradores (2017) avaliaram a espessura da mucosa peri-implantar associada a diferentes sítios e observaram maior espessura na região anterior da maxila (4,25 mm) em relação a região posterior de maxila (3,75 mm) ou mandíbula (3 mm). Algumas revisões sistemáticas, após avaliarem a influência da espessura da mucosa na perda óssea, observaram que regiões com menor espessura apresentaram maior perda óssea no primeiro ano de carga funcional (SUAREZ-LOPEZ et al., 2016; GIANFILIPPO et al., 2020). Os conectores de titânio do nosso estudo foram instalados em região posterior de maxila/mandíbula, local com menor espessura da mucosa em relação a região anterior de maxila, onde foram instalados os conectores de zircônia, o que pode justificar os maiores valores de perda óssea total observado nos sítios associados aos conectores de titânio ( $0,99 \pm 0,41$  mm; média  $\pm$  DP) em relação aos de zircônia ( $0,76 \pm 0,21$  mm; média  $\pm$  DP), embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada. Resultados semelhantes foram observados por diversos estudos clínicos, após avaliarem a perda óssea ao redor de implantes restaurados com conectores protéticos de titânio ou zircônia, não observaram diferença significativa na perda óssea após 1 ano (HOSSEINI et al., 2011; CARRILLO DE ALBORNOZ et al., 2014), 2 anos (PAYER et al., 2015), 3 anos (ZEMBIC et al., 2009; HOSSEINI et al., 2013) e 5 anos de acompanhamento (LOPS et al., 2013; ZEMBIC et al., 2013).

A terceira hipótese do estudo, referente a possível correlação entre os parâmetros clínicos de restauração dos implantes com os achados microbianos, também foi confirmada. Como esperado, o biofilme submucoso associado a ambos os substratos apresentaram grandes correlações com os desfechos clínicos. Os resultados microbiológicos de índices de diversidade e contagens de bactérias periodontais mostraram correlações próximas com alguns parâmetros clínicos obtidos nos períodos investigados (profundidade de sondagem, sangramento a sondagem e perda óssea marginal). Demonstramos correlações próximas com achados para índices de diversidade e contagens de bactérias periodontais. O titânio não foi correlacionado com a profundidade de sondagem, enquanto a zircônia foi não correlacionada com os indicadores clínicos sangramento à sondagem e perda óssea. Os índices de diversidade se correlacionaram com a profundidade de sondagem, enquanto a riqueza de espécies foi mais associada a sangramento à sondagem e perda óssea. As correlações podem sugerir uma relação

causal subjacente entre as variáveis comparadas, no entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que aplicamos um desenho *quase-experimental* controlado sem randomização da alocação dos conectores, os valores das correlações podem ser o resultado do acaso ou influenciados por outra variável oculta. Os resultados apresentados nesse estudo reportam informações que podem ser consideradas relevantes e complementares aquelas já discutidas por investigações que abordam o mesmo tema. Os dados obtidos podem também auxiliar no esclarecimento de algumas questões pertinentes ao assunto e orientar no desenvolvimento de pesquisas futuras. A determinação da causalidade da microbiota relacionada ao titânio e à zircônia nos desfechos clínicos deve ser investigada em estudos randomizados controlados de longo prazo. Este estudo destaca as mudanças microbianas que ocorrem no microbioma oral associado a diferentes materiais nas restaurações suportadas por implantes ao longo do tempo e a importância do monitoramento dos resultados clínicos. Além disso, os resultados apresentados trouxeram novas informações sobre o microbioma oral associados aos substratos de titânio e zircônia e têm implicações importantes para estudos futuros que explorem a relação entre o microbioma oral, características de superfície e resultados clínicos.



*Conclusões*

---





## 6. CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais do presente estudo e os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Os conectores de titânio apresentaram aumento significativo na profundidade de sondagem após 12 meses, enquanto a zircônia reduziu no mesmo período. Após 12 meses de acompanhamento não houve diferença significativa entre os substratos investigados.
- Os dois materiais apresentaram um aumento no sangramento à sondagem após os primeiros 12 primeiros meses de função, mas com valores inferiores aos reportados para doenças peri-implantares e sem diferença significativa entre os grupos.
- Ambos conectores apresentaram aumento na recessão gengival ao longo dos períodos investigados, mas sem diferença significativa entre os grupos.
- Não houve diferença em relação à perda óssea total para ambos os conectores após 3 anos de função, permanecendo dentro dos limites de saúde.
- Os implantes restaurados com conectores de titânio e zircônia apresentaram diferenças e variações nas comunidades microbianas ao longo de 3 anos de investigação, sugerindo que microbioma do biofilme formado é influenciado pelo tipo de material utilizado como conector.
- Titânio e zircônia apresentaram diferenças da variável Riqueza de espécies, Diversidade e contagem de Unidades Taxonômicas Universais (OTUs).
- A similaridade das comunidades dos diferentes substratos aumentou ao longo do tempo investigado, mas permaneceu com diferenças significantes ao longo dos 3 anos de função.
- Os microbiomas relacionados aos implantes mostraram resultados bem diferentes em relação ao microbioma dos dentes remanescentes.

- O tempo de função dos implantes não influenciou na diversidade, mas mostrou uma relação positiva com as contagens de OTUs, que aumentaram ao longo do tempo.
- Os achados clínicos indicam uma situação de saúde para ambos os grupos e as correlações encontradas podem sugerir uma relação causal subjacente entre os achados microbianos e os resultados clínicos.

## *Referências*

---



## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, 2005.
- ABDELHAMED, M. I.; GALLEY, J. D.; BAILEY, M. T.; JOHNSTON, W. M.; HOLLOWAY, J.; MCGLUMPHY, E.; LEBLEBICIOGLU, B. A comparison of zirconia and titanium abutments for microleakage. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 17, n. 2), p. 643–51, 2015.
- ABRANCHES, J.; ZENG, L.; KAJFASZ, J. K.; PALMER, S. R.; CHAKRABORTY, B.; WEN, Z. T.; RICHARDS, V. P.; BRADY, L. J.; LEMOS, J. A. Biology of oral streptococci. **Microbiol Spectr**, v. 6, n. 5, 2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- AL-AHMAD, A.; MUZAFFERIY, F.; ANDERSON, A. C.; et al. Shift of microbial composition of peri-implantitis-associated oral biofilm as revealed by 16S rRNA gene cloning. **J Med Microbiol**, v. 67, n. 3, p. 332-340, 2018. doi:10.1099/jmm.0.000682
- ALGHAMDI, H. S.; JANSEN, J. A. The development and future of dental implants. **Dent Mater J**, v. 39, n. 2, p. 167-172, 2020. doi: 10.4012/dmj.2019-140. Epub 2020 Jan 22. PMID: 31969548.
- ALGHAMDI, H. S.; JANSEN, J. A. The development and future of dental implants. **Dent Mater J**, v. 39, n. 2, p. 167-172, 2020. doi:10.4012/dmj.2019-140
- AL-RADHA, A. S.; DYMOCK, D.; YOUNES, C.; O'SULLIVAN, D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. **J Dent**, v. 40, n. 2, p. 146-53, 2012. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.006. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22182466
- AMORFINI, L.; STORELLI, S.; MOSCA, D.; SCANFERLA, M.; ROMEO, E. Comparison of Cemented vs Screw-Retained, Customized Computer-Aided Design/Computer-Assisted Manufacture Zirconia Abutments for Esthetically Located Single-Tooth Implants: A 10-Year Randomized Prospective Study. **Int J Prosthodont**, v. 31, n. 4, p. 359–366, 2018. doi: 10.11607/ijp.5305. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29624628.
- AMORFINI, L.; STORELLI, S.; MOSCA, D.; SCANFERLA, M.; ROMEO, E. Comparison of Cemented vs Screw-Retained, Customized Computer-Aided Design/Computer-Assisted Manufacture Zirconia Abutments for Esthetically Located Single-Tooth Implants: A 10-Year Randomized Prospective Study. **Int J Prosthodont**, v. 31, n. 4, p. 359–366, 2018. doi:10.11607/ijp.5305
- ASSAF, A.; SAAD, M.; HIJAWI, S. Use of narrow-diameter implants in the posterior segments of the jaws: A retrospective observational study of 2 to 11 years. **J Prosthet Dent**, v. 18, n. 22, 2022. doi: 10.1016/j.prosdent.2022.01.017.
- BARBOUR, M. E.; O'SULLIVAN, D. J.; JENKINSON, H. F.; JAGGER, D. C. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. **J Mater Sci Mater Med**, v. 18, n. 7, p. 1439-47, 2007. doi: 10.1007/s10856-007-0141-2. Epub 2007 Mar 27. PMID: 17387587

BELIBASAKIS, G. N.; CHARALAMPAKIS, G.; BOSTANCI, N., STADLINGER, B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. **Adv Exp Med Biol**, v. 830, p. 69-84, 2015. doi:10.1007/978-3-319-11038-7\_4

BELSTRØM, D.; SEMBLER-MØLLER, M. L.; GRANDE, M. A.; KIRKBY, N.; COTTON, S. L.; PASTER, B. J.; TWETMAN, S.; HOLMSTRUP, P. Impact of Oral Hygiene Discontinuation on Supragingival and Salivary Microbiomes. **JDR Clin Trans Res**, v. 3, n. 1, p. 57-64, 2018. doi: 10.1177/2380084417723625. Epub 2017 Jul 31. PMID: 29662960; PMCID: PMC5896869.

BELSTRØM, D.; SEMBLER-MØLLER, M. L.; GRANDE, M. A.; et al. Impact of Oral Hygiene Discontinuation on Supragingival and Salivary Microbiomes. **JDR Clin Trans Res**, v. 3, n. 1, p. 57-64, 2018. doi:10.1177/2380084417723625

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

BERGLUNDH, T.; ZITZMANN, N. U.; DONATI, M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? **J Clin Periodontol**, v. 38, p. 188-202, 2011.

BIDRA A.; RUNGRUANGANUNT, P. Clinical Outcomes of Implant Abutments in the Anterior Region: A Systematic Review. **J Esthet Restor Dent**. v. 25, n. 3, p. 159-176, 2013.

BLACK, D. L.; TURKYILMAZ, I.; LIEN, W.; CHONG, C. H. Evaluation of the Sealing Capability of the Internal Conical Connections of Implants with Titanium and Zirconia Abutments. **J Contemp Dent Pract**, v. 18, n. 10, p. 915-922, 2017. Published 2017 Oct 1. doi:10.5005/jp-journals-10024-2149

BOLLEN, C. M.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin Oral Implants Res**, v. 7, p. 201-11, 1996.

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. **J Periodontol**, v. 76, n. 9, p. 1490-1495, 2005. doi:10.1902/jop.2005.76.9.1490

BRUM, R. S.; APAZA-BEDOYA, K.; LABES, L. G.; VOLPATO, C.; PIMENTA, A. L.; BENFATTI, C. Early Biofilm Formation on Rough and Smooth Titanium Specimens: a Systematic Review of Clinical Studies. **J Oral Maxillofac Res**, v. 12, n. 4, 2021. doi: 10.5037/jomr.2021.12401.

BÜRGER, R.; GERLACH, T.; HAHNEL, S.; SCHWARZ, F.; HANDEL, G.; GOSAU, M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 2, p. 156-164, 2010. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x

BUSER, D.; JANNER, S. F.; WITTNEBEN, J. G.; BRAGGER, U.; RAMSEIER, C. A.; SALVI, G. E. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, p. 839-851, 2012.

- BUSER, D.; SENNERBY, L.; DE BRUYN, H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. **Periodontol** 2000, v. 73, n. 1, p. 7-21, 2017. doi: 10.1111/prd.12185.
- CAI, H.; CHEN, J.; LI, C.; WANG, J.; WAN, Q.; LIANG, X.; Quantitative discoloration assessment of peri-implant soft tissue around zirconia and other abutments with different colours: A systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 70, p. 110-117, 2018. doi: 10.1016/j.jdent.2018.01.003.
- CANEVA, M.; SALATA, L. A.; DE SOUZA, S. S.; BAFFONE, G.; LANG, N. P.; BOTTICELLI, D. Influence of implant positioning in extraction sockets on osseointegration: histomorphometric analyses in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. 43-49, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01842.x.
- CANULLO L, PESCE P, BOTTICELLI D, COVANI, U.; JANKOVIC, S.; JOVANOVIĆ, T.; RAKIĆ, M. What is the Impact of Epstein-Barr Virus in Peri-implant Infection? **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 33, p. 58–63 30, 2018. doi:10.11607/jomi.5972
- CARRASCO-GARCÍA, A.; CASTELLANOS-COSANO, L.; CORCUERA-FLORES, J. R.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, A.; TORRES-LAGARES, D.; MACHUCA-PORTILLO, G. Influence of marginal bone loss on peri-implantitis: systematic review of literature. **J Clin Exp Dent**, v. 11, n. 11, p. 1045-1071, 2019. <https://doi.org/10.4317/jced.56202>.
- CARRILLO DE ALBORNOZ, A.; VIGNOLETTI, F.; FERRANTINO, L.; CARDENAS, E.; DE SANCTIS, M.; SANZ, M. A randomized trial on the aesthetic outcomes of implant-supported restorations with zirconia or titanium abutments. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 12, p. 1161-1169, 2014.
- CASSETTA, M.; DRIVER, A.; BRANDETTI, G.; CALASSO, S. Peri-implant bone loss around platform-switched Morse taper connection implants: a prospective 60-month follow-up study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 12, p. 1577-1585, 2016. doi:10.1016/j.ijom.2016.09.009
- CATON, J.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, K. S.; MEALEY, B. L.; PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; TONETTI, M. S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol**, v. 45:S1–8, 2018. doi: 10.1111/jcpe.12935.
- CERUSO, F. M.; BARNABA, P.; MAZZOLENI, S.; OTTRIA, L.; GARGARI, M.; ZUCCON, A.; BRUNO, G.; DI FIORE, A. Implant-abutment connections on single crowns: a systematic review. **Oral Implantol (Rome)**, v. 10, n. 4, p. 349-353, 2017. doi: 10.11138/orl/2017.10.4.349. PMID: 29682251; PMCID: PMC5892659.
- CHANG, M.; WENNSTROM, J. L. Peri-implant soft tissue and bone crest alterations at fixed dental prostheses: a 3-year prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 5, p. 527-534, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01874.x.
- CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, v. 11, p. 265–70, 1984.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **JASA**, 87: 210–7, 1992.

CLEVER, K.; SCHLEGEL, K. A.; KNIHA, H. Experimental peri-implant mucositis around titanium and zirconia implants in comparison to a natural tooth: part 2—clinical and microbiological parameters. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 48, n. 4, p. 560-565, 2018. <https://doi.org/10.1016/j>.

CORAY, R.; ZELTNER, M.; ÖZCAN, M. Fracture strength of implant abutments after fatigue testing: A systematic review and a meta-analysis. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 62, p. 333-346, 2-16. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.05.011.

CORINALDESI, C.; DANOVARO, R.; DELL'ANNO, A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 46–50, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.46-50.2005>.

CÔRTE, B.; LOPES, RGC (Orgs.) Longeviver, políticas e mercado, **Portal Edições**, SP, 2019.

CRUZ, M. B. D.; MARQUES, J. F.; FERNANDES, B. F.; et al. Gingival fibroblasts behavior on bioactive zirconia and titanium dental implant surfaces produced by a functionally graded technique. **J Appl Oral Sci**, v. 28, p. 20200100, 2020. doi:10.1590/1678-7757-2020-0100

DABDOUB, S. M.; TSIGARIDA, A. A.; KUMAR, P. S. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. **J Dent Res**, v.92, n. 12, p. 168S-175S, 2013.

DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; LIMA, B. P.; LUX, R.; SHI, W.; JUNIOR, M. J.; SPOLIDORIO, D. M.; VERGANI, C. E.; MOLLO JUNIOR, F. A. M. Impact of Physical Chemical Characteristics of Abutment Implant Surfaces on Bacteria Adhesion. **J Oral Implantol**, v. 42, n. 2, p. 153-8, 2016. doi: 10.1563/aaid-joi-D-14-00318.

DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; VERGANI, C. E.; MOLLO JUNIOR, F. A. M., SALIH, V. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. **Materials**, v. 7, n. 5, p. 3651-3662, 2014. <https://doi.org/10.3390/ma7053651>.

DE FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O. ; RIBEIRO, R. F. ; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. ; PEDRAZZI, V. ; DO NASCIMENTO, C. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, p. 2335-2343, 2018.

DE MEDEIROS, F. C. F. L.; KUDO, G. A. H.; LEME, B. G.; SARAIVA, P. P.; VERRI, F. R.; HONÓRIO, H. M.; PELLIZZER, E. P.; SANTIAGO JUNIOR, J. F. Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 4, p. 480-491, 2018. doi: 10.1016/j.ijom.2017.05.021. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651805.

DEGIDI, M.; NARDI, D.; PIATTELLI, A. 10-year follow-up of immediately loaded implants with TiUnite porous anodized surface. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, p. 828–838, 2012.

DI GIANFILIPPO, R.; VALENTE, N. A.; TOTI, P.; WANG, H. L.; BARONE, A. Influence of implant mucosal thickness on early bone loss: a systematic review with meta-analysis. **J Periodontal Implant**, v. 50, n. 4, p. 209-225, 2020. doi: 10.5051/jpis.1904440222.



- DIAZ, P. I.; VALM, A. M. Microbial Interactions in Oral Communities Mediate Emergent Biofilm Properties. **J Dent Res**, v. 99, n. 1, p. 18-25, 2020. doi: 10.1177/0022034519880157.
- DO NASCIMENTO, C.; PITA, FERNANDES, F.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE JR., R.F; RIBEIRO, R. F. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces, **Clin. Oral Implan Res**, v. 25, n. 3, p. 337–343, 2014. doi: 10.1111/clr.12093.
- DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; SANTOS, E. D. S, et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. **Dent Mater**, v. 32, n. 1, p. 93- 101, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.014>.
- DREYER, H.; GRISCHKE, J.; TIEDE, C. et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review. **J Periodontal Res**, v. 53, n. 5, p. 657-681, 2018. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>.
- DUARTE, P. M.; SERRÃO, C. R.; MIRANDA, T. S., et al. Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. **J Periodontal Res**, v. 51, p. 689–98 12, 2016.
- EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nat Methods**, v. 10, n. 10, p. 996-998, 2013.
- ENGEL, A. S.; KRANZ, H. T.; SCHNEIDER, M.; TIETZE, J. P.; PIWOWARCYK, A.; KUZIUS, T.; ARNOLD, W.; NAUMOVA, E. A. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 1, p. 162, 2020. doi: 10.1186/s12903-020-01147-x.
- ESFAHANIZADEH, N.; MIRMALEK, S. P.; BAHADOR, A.; DANESHPARVAR, H.; AKHOUNDI, N.; POURHAJIBAGHER, M. Formation of biofilm on various implant abutment materials. **Gen Dent**, v. 66, n. 5, p. 39-44, 2018.
- FAOT, F.; NASCIMENTO, G. G.; BIELEMANN, A. M., et al. Can Peri-Implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of Peri-Implantitis? A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Periodontol**, v. 86, p. 631–45, 2015.
- FAURE, E.; FAURE, K.; FIGEAC, M.; et al. Vaginal Mucosal Homeostatic Response May Determine Pregnancy Outcome in Women With Bacterial Vaginosis: A Pilot Study. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 5, p. 2668, 2016. doi:10.1097/MD.0000000000002668
- FERANCHUK, S.; BELKOVA, N.; POTAPOVA, U.; KUZMIN, D.; BELIKOV, S. Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. **Res Microbiol**, v. 169, n 4-5, p. :254-261, 2018. doi: 10.1016/j.resmic.2018.03.004.
- FERREIRA, S. D.; SILVA, G. L.; CORTELLI, J. R.; COSTA, J. E.; COSTA, F. O. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 12, p. 929-35, 2006. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.01001.x.
- FICKL, S. Peri-implant mucosal recession: Clinical significance and therapeutic opportunities. **Quintessence Int**, v. 46, n. 8, p. 671-676, 2015.
- FISCHER, K.; STENBERG, T. Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implantsupported full-arch maxillary prostheses. Part 1: sandblasted

and acid-etched implants and mucosal tissue. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, p. 808–815, 2012.

FISCHER, K.; STENBERG, T. Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implant-supported full-arch maxillary prostheses. Part 1: sandblasted and acid-etched implants and mucosal tissue. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, n. 6, p. 808-815, 2012. doi:10.1111/j.1708-8208.2011.00389.x

FOONG, J. K.; JUDGE, R. B.; PALAMARA, J. E.; SWAIN, M. V. Fracture resistance of titanium and zirconia abutments: an in vitro study. **J Prosthet Dent**, v. 109, n. 5, p. 304-12. doi: 10.1016/S0022-3913(13)60306-6.

FUCHIGAMI, K.; MUNAKATA, M.; KITAZUME, T.; TACHIKAWA, N.; KASUGAI, S.; KURODA, S. A diversity of peri-implant mucosal thickness by site. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 2, p. 171-176, 2017. doi:10.1111/clr.12778

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

GERBER, J.; WENAWESER, D.; HEITZ-MAYFIELD, L.; LANG, N. P.; RUTGER; PERSSON, G. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 1, p. 1-7 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01197.x>.

GIANFILIPPO, R.; VALENTE, N. A.; TOTI, P.; WANG, H. L.; BARONE, A. Influence of implant mucosal thickness on early bone loss: a systematic review with meta-analysis. **J Periodontal Implant Sci**, v. 50, n. 4, p. 209-225, 2020. doi:10.5051/jpis.1904440222

GOTFREDSSEN K. A 10-year prospective study of single tooth implants placed in the anterior maxilla. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, 80–87, 2012,

HAHNEL, S.; WIESER, A.; LANG, R.; ROSENTRITT, M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. **Clin Oral Implants Res**; v. 26, n. 11, p. 1297-1301, 2015. <https://doi.org/10.1111/clr.12454>.

HANAWA, T. Zirconia versus titanium in dentistry: A review. **Dent Mater J**, v. 39, n. 1, p. 24-36, 2020.. doi:10.4012/dmj.2019-172

HANNIG, M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. **Eur J Oral Sci**, v. 10, n. 5, p. 422–433, 1997.

HAO, Y.; HUANG, X.; ZHOU, X.; et al. Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. **Int J Mol Sci**, v. 19, n 10, p. 3157, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19103157>.

HEIERLE, L.; WOLLEB, K.; HÄMMERLE, C. H.; WIEDEMEIER, D. B.; SAILER, I.; THOMA, D. S. Randomized Controlled Clinical Trial Comparing Cemented Versus Screw-Retained Single Crowns on Customized Zirconia Abutments: 3-Year Results. **Int J Prosthodont**, v. 32, n 2, p. 174-176, 2019. doi: 10.11607/ijp.6080. PMID: 30856641.

HOJO, K., NAGAOKA, S., OHSHIMA, T. & MAEDA, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. **Journal of Dental Research**, v. 88, p. 982–990, 2009.

HORIGUCHI, Y.; FURUKAWA, F.; FUJITA, M.; IMAMURA, S. Ultrastructural localization of E-cadherin cell adhesion molecule on the cytoplasmic membrane of keratinocytes in vivo and in vitro. **J Histochem Cytochem**, v. 42, n. 10, p. 1333-1340, 1994. doi:10.1177/42.10.7930515

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

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

HOSSEINI, M.; WORSAAE, N.; SCHIØDT, M.; GOTFREDSEN, K. A 3-year prospective study of implant-supported, single-tooth restorations of all-ceramic and metal-ceramic materials in patients with tooth agenesis. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 10, p. 1078-87, 2013. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02514.x. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22708959.

HOWE, M. S.; KEYS, W.; RICHARDS, D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. **J Dent**, v. 84, p. 9-21, 2019. doi:10.1016/j.jdent.2019.03.008

HU, M.; CHEN, J.; PEI, X.; HAN, J.; WANG, J. Network meta-analysis of survival rate and complications in implant-supported single crowns with different abutment materials. **J Dent**, v. 88, p. 103115, 2019. doi: 10.1016/j.jdent.2019.04.007

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* v. 2, n. 5, p. 435–444, 2014.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v 67, p.4399-06, 2001.

JANKOVIC, S.; ALEKSIC, Z.; DIMITRIJEVIC, B.; et al. Correlation between different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus and peri-implant tissue status. **Aust Dent J**, v. 56, p. 382–8, 2011.

JANKOVIC, S.; ALEKSIC, Z.; DIMITRIJEVIC, B.; et al.: Prevalence of human cytomegalovirus and EpsteinBarr virus in subgingival plaque at peri-implantitis , mucositis and healthy sites . A pilot study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 40, p. 271–6, 2011.

JANTO, M.; IURCOV, R.; DAINA, C. M.; NECULOIU, D. C.; VENTER, A. C.; BADAU, D.; COTOVANU, A.; NEGRAU, M.; SUTEU, C. L.; SABAU, M.; DAINA, L. G. Oral Health among Elderly, Impact on Life Quality, Access of Elderly Patients to Oral Health Services and Methods to Improve Oral Health: A Narrative Review. **J Pers Med**, v. 12, n. 3, p. 372, 2022. doi: 10.3390/jpm12030372. PMID: 35330372; PMCID: PMC8950250.

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

JUNG, R. E.; HOLDEREGGER, C.; SAILER, I.; KHRAISAT, A.; SUTER, A.; HAMMERLE, C.H. The effect of all-ceramic and porcelain-fused-to-metal restorations on marginal peri-implant soft tissue color: a randomized controlled clinical trial. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 28, p. 357–365, 2008.

KATO, A.; IMAI, K.; SATO, H.; et al. Prevalence of Epstein-Barr virus DNA and Porphyromonas gingivalis in Japanese peri-implantitis patients. **BMC Oral Health**, v. 17, p. 1–7, 2017.

KENSARA, A.; HEFNI, E.; WILLIAMS, M. A.; SAITO, H.; MONGODIN, E.; MASRI, R. Microbiological Profile and Human Immune Response Associated with Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Prosthodont**, v. 30, n. 3, p. 210-234, 2021. doi: 10.1111/jopr.13270. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33016381.

KENSARA, A.; HEFNI, E.; WILLIAMS, M. A.; SAITO, H.; MONGODIN, E.; MASRI, R. Microbiological Profile and Human Immune Response Associated with Peri-Implantitis: A Systematic *Review*. **J Prosthodont.**, v. 30,n.3, p. 210-234, 2021. doi:10.1111/jopr.13270

KIM, A.; CAMPBELL, S.D.; VIANA, M.A.G.; KNOERNSCHILD, K.L. Abutment Material Effect on Peri-implant Soft Tissue Color and Perceived Esthetics. **Journal of Prosthodontics**. v. 00, p. 1–7, 2015. doi: 10.1111/jopr.12360.

KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R.; et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.

KNIHA, K.; HEUSSEN, N.; MODABBER, A.; HÖLZLE, F.; MÖHLHENRICH, S. C. The effect of zirconia and titanium surfaces on biofilm formation and on host-derived immunological parameters. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 10, p. 1361-1374, 2021. doi:10.1016/j.ijom.2021.01.021

KORDBACHEH, C. K.; FINKELSTEIN, J.; PAPAPANOU, P. N. Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: a study of electronic health records at a U.S. dental school. **Clin Oral Implants Res**, v. 30, n. 4, p. 306-314, 2019. <https://doi.org/10.1111/clr.13416>.

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

KRAUS, R. D.; EPPRECHT, A.; HÄMMERLE, C. H. F. SAILER, I.; THOMA, D. S. Cemented vs screw-retained zirconia-based single implant reconstructions: A 3-year prospective randomized controlled clinical trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 21, n. 4, p. 578-585, 2019. doi: 10.1111/cid.12735. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30861635.

KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity

estimates. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 118-123, 2010. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x

KUNRATH, M. F.; GUPTA, S.; LORUSSO, F.; SCARANO, A.; NOUMBISSI, S. Oral Tissue Interactions and Cellular Response to Zirconia Implant-Prosthetic Components: A Critical Review. **Materials (Basel)**, v. 14, n 11, p. 2825, 2021. Published 2021 May 25. doi:10.3390/ma14112825

LAFaurIE, G. I.; SABOGAL, M. A.; CASTILLO, D. M.; RINCÓN, M. V.; GÓMEZ, L. A.; LESMES, Y. A.; CHAMBRONE, L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol**, v. 88, n. 10, p. 1066-1089, 2017. doi: 10.1902/jop.2017.170123. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28625077.

LARSEN, T.; FIEHN, N. E. Dental biofilm infections - an update. **APMIS**, v. 125, n.. 4, p. 376-384, 2017. doi:10.1111/apm.12688

LAURITANO, D.; MOREO, G.; DELLA VELLA, F.; DI STASIO, D.; CARINCI, F.; LUCCHESI, A.; PETRUZZI, M. Oral Health Status and Need for Oral Care in an Aging Population: A Systematic Review. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 22, p. 4558, 2019. doi: 10.3390/ijerph16224558. PMID: 31752149; PMCID: PMC6888624.

LEE, C. T.; HUANG, Y. W.; ZHU, L.; WELTMAN, R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 62, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.

LEUTERT, C. R.; STAWARCZYK, B.; TRUNINGER, T. C.; HÄMMERLE, C. H.; SAILER, I. Bending moments and types of failure of zirconia and titanium abutments with internal implant-abutment connections: a laboratory study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 27, n. 3, p. 505-12, 2012.. PMID: 22616042.

LI, X.; QI, M.; SUN, X.; WEIR, M. D.; TAY, F. R.; OATES, T. W.; DONG, B.; ZHOU, Y.; WANG, L.; XU, H. H. K. Surface treatments on titanium implants via nanostructured ceria for antibacterial and anti-inflammatory capabilities. **Acta Biomater**, v. 94, p. 627-643, 2019. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.023. Epub 2019 Jun 15. PMID: 31212111.

LIMA, E. M.; KOO, H.; SMITH, A. M.; ROSALEN, P. L.; DEL BEL CURY, A. A. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, p. 780–785, 2008.

LINDHE, J.; MEYLE, J. Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8, p. 282-5, 2008. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x. PMID: 18724855.

LINKEVICIUS, T.; VAITELIS, J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and metaanalysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, p. 139-147, 2015. <https://doi.org/10.1111/clr.12631>.

LIU, X.Q.; DAN, L.I.; YING, L.I. Clinical effect of ceramic abutment and titanium abutment:a meta-analysis, **J. Clin. Stomatol**, v. 31, n. 4, p. 195–198, 2015.

- LOPS, D.; BRESSAN, E.; CHIAPASCO, M.; ROSSI, A.; ROMEO, E. Zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implant prostheses after 5 years of function in posterior regions. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, n. 1, p. 281-287, 2013.
- LOPS, D.; STELLINI, L.; SBRICOLI, N. C.; ROMEO, E.; BRESSAN, E. Influence of abutment material on peri-implant soft tissues in anterior areas with thin gingival biotype: a multicentric prospective study, **Clin. Oral Implan Res**, v. 28, n. 10, p. 1263–1268, 2016.
- LORENZETTI, M.; DOGŠA, I.; STOŠICKI, T.; et al. The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 7, n. 3, p. 1644-1651, 2015. doi:10.1021/am507148n
- MAILLOA, J.; ARNETT, M.; CHAN, H. L.; GEORGE, F. M.; KAIGLER, D.; WANG, H. L. The Association Between Buccal Mucosa Thickness and Periimplant Bone Loss and Attachment Loss: A Cross-Sectional Study. *Implant Dent*, v. 27, n. 5, p. 575-581, 2018. doi:10.1097/ID.0000000000000803
- MANGANO, C.; MANGANO, F.; PIATTELLI, A.; IEZZI, G.; MANGANO, A.; LA COLLA, L. Prospective clinical evaluation of 307 single-tooth morse taper-connection implants: a multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, n. 2, p. 394-400, 2010.
- MARSH, P. D Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, Pt 2, p. 279–294, 2003.
- MARSH, P. D.; DEVINE, D. A. How is the development of dental biofilms influenced by the host? **J Clin Periodontol**, v. 38, Suppl 11, p. 28–35, 2011.
- MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **J Clin Periodontol**, v. 44, n. 18, p. 12-22, 2017. doi: 10.1111/jcpe.12679. PMID: 28266111.
- MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **J Clin Periodontol**, v. 44, Suppl 18, p. S12-S22, 2017. doi:10.1111/jcpe.12679
- MAZZOCCO, F.; JIMENEZ, D.; BARALLAT, L.; PANIZ, G.; DEL FABBRO, M.; NART, J. Bone volume changes after immediate implant placement with or without flap elevation. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 4, p. 495-501, 2017.
- MCCRACKEN, B. A.; GARCIA, N. M. Phylum Synergistetes in the oral cavity: A possible contributor to periodontal disease. **Anaerobe**, v. 68, p. 102250, 2021. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102250. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32791127
- MOLINA, A.; SANZ-SÁNCHEZ, I.; MARTÍN, C.; BLANCO, J.; SANZ, M. The effect of one-time abutment placement on interproximal bone levels and peri-implant soft tissues: a prospective randomized clinical trial. **Clin. Oral Implan Res**, v. 28, n. 4, p. 443–452, 2016.
- MOMBELLI, A.; MÜLLER, N.; CIONCA, N. The epidemiology of peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 6, p. 67-76, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x>.
- MOUHAT, M.; MOOREHEAD, R.; MURDOCH, C. *In vitro Candida albicans* biofilm formation on different titanium surface topographies. **Biomater Investig Dent**, v. 9, n. 7, p. 146-157, 2020. doi: 10.1080/26415275.2020.1829489. PMID: 33134957; PMCID: PMC7580804

- MUDDUGANGADHAR, B. C.; AMARNATH, G. S.; SONIKA, R.; CHHEDA, P. S.; GARG, A. Meta-analysis of Failure and Survival Rate of Implant-supported Single Crowns, Fixed Partial Denture, and Implant Tooth-supported Prostheses. **J Int Oral Health**, v. 7, n. 9, p. 11-17, 2015.
- NAERT, I.; DUYCK, J.; VANDAMME, K. Occlusal overload and bone/implant loss. *Clin Oral Implants Res*, v. 23, n. 6, p. 95-107, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02550.x. PMID: 23062133.
- NAUJOKAT, H.; KUNZENDORF, B.; WILTFANG, J. Dental implants and diabetes mellitus--a systematic review. *Int J Implant Dent*, v. 2, n. 1, p. 5, 2016. doi: 10.1186/s40729-016-0038-2. Epub 2016 Feb 11. PMID: 27747697; PMCID: PMC5005734.
- NAVEAU, A.; RIGNON-BRET, C.; WULFMAN, C. Zirconia abutments in the anterior region: A systematic review of mechanical and esthetic outcomes. **J Prosthet Dent**, v. 121, n. 5, p. 775-781, 2019.e1. doi:10.1016/j.prosdent.2018.08.005
- NOGUCHI, T.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H. et al. Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Inflammation**, v. 27, n. 6, p. 341-349, 2003. doi:10.1023/b:ifla.0000006702.27906.e9
- NOTHDURFT, F. P.; FONTANA, D.; RUPPENTHAL, S, et al. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 17, n. 6, p. 1237-1249, 2015. doi:10.1111/cid.12253
- NOTHDURFT, F.P., FONTANA, D., RUPPENTHAL, S., MAY, A., AKTAS, C., MEHRAEIN, Y., LIPP, P. & KAESTNER, L. Differential behavior of fibroblasts and epithelial cells on structured implant abutment materials: a comparison of materials and surface topographies. **Clinical Implant Dentistry & Related Research**, 2014. doi: 10.1111/cid.12253. [Epub ahead of print].
- OH, J. K.; YEGIN, Y.; YANG, F.; et al. The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1>.
- PAPASPYRIDAKOS, P.; CHEN, C. J.; SINGH, M.; WEBER, H. P.; GALLUCCI, G. O. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. **J Dent Res**, v. 91, n. 3, p. 242-248, 2012. doi:10.1177/0022034511431252
- PARREIRA, P.; MAGALHÃES, A.; GONÇALVES, I. C.; GOMES, J.; VIDAL, R.; REIS, C. A.; LECKBAND, D. E.; MARTINS, M. C. Effect of surface chemistry on bacterial adhesion, viability, and morphology. **J Biomed Mater Res A**, v. 1, n. 99, p. 344-53, 2011. doi: 10.1002/jbm.a.33178. Epub 2011 Aug 23. PMID: 22021182.
- PAYER, M.; HESCHL, A.; KOLLER, M.; ARNETZL, G.; LORENZONI, M.; JAKSE, N. All-ceramic restoration of zirconia two-piece implants--a randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 371-376, 2015.
- PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; DUARTE, P. M.; SHIBLI, J. A.; MONTENEGRO, S.; LACERDA, H. S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; FERES, M. The Current Weight of

Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol**, v. 87, n. 11, p. 1295-1304, 2016. doi: 10.1902/jop.2016.160184. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27420109.

PESSOA, R. S.; SOUSA, R. M.; PEREIRA, L. M.; NEVES, F. D.; BEZERRA, F. J.; JAECQUES, S. V.; SLOTEN, J. V.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; SPIN-NETO, R. Bone Remodeling Around Implants with External Hexagon and Morse-Taper Connections: A Randomized, Controlled, Split-Mouth, Clinical Trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 19, n. 1, p. 97-110, 2017.

PIERI, F.; ALDINI, N. N.; MARCHETTI, C.; CORINALDESI, G. Influence of implant-abutment interface design on bone and soft tissue levels around immediately placed and restored single-tooth implants: a randomized controlled clinical trial. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 1, p. 169-178, 2011.

PITA, M. S.; DO NASCIMENTO, C.; DOS SANTOS, C. G. P.; PIRES, I. M.; PEDRAZZI, V. Experimental conical-head abutment screws on the microbial leakage through the implant-abutment interface: an in vitro analysis using target-specific DNA probes. **Clin Oral Implants Res**, v. 28, n. 7, p. 68-75, 2017. <https://doi.org/10.1111/clr.12876>.

PITTA, J.; ZARAUZ, C.; PJETURSSON, B.; SAILER, I.; LIU, X.; PRADIES, G. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Influence of Abutment Material on Peri-implant Soft Tissue Color Measured Using Spectrophotometry. **Int J Prosthodont**, v. 33, n. 1, p. 39-47, 2020. doi: 10.11607/ijp.6393. PMID: 31860912.

PJETURSSON, B. E.; ZARAUZ, C.; STRASDING, M.; SAILER, I.; ZWAHLEN, M.; ZEMBIC, A. A systematic review of the influence of the implant-abutment connection on the clinical outcomes of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n. 18, p. 160-183, 2018. doi: 10.1111/clr.13362. PMID: 30306682.

POZZI A, ARCURI L, FABBRI G, SINGER G, LONDONO J. Long-term survival and success of zirconia screw-retained implant-supported prostheses for up to 12 years: A retrospective multicenter study. **J Prosthet Dent**, v. 26, n. 00, 2021. doi: 10.1016/j.prosdent.2021.04.026. Epub ahead of print. PMID: 34187699.

POZZI A, MURA P. Clinical and radiologic experience with moderately rough oxidized titanium implants: up to 10 years of retrospective follow-up. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 1, p. 152-61, 2014. doi: 10.11607/jomi.3306. PMID: 24451866

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J Clin Periodontol**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1995. doi: 10.1111/j.1600-051x.1995.tb01765.x. PMID: 7706534.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infection risks for oral implants: A review of the literature. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, p. 1-19, 2002.

QUIRYNEN, M.; VAN ASSCHE, N. Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 6, p. 581-589, 2011.



QUIRYNEN, M.; VOGELS, R.; PEETERS, W.; VAN STEENBERGHE, D.; NAERT, I.; HAFFAJEE, A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 1, p. 25-37, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01194.x>.

RAFFAINI, F. C.; FREITAS, A. R.; SILVA, T. S.O.; et al. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. **Biofouling**, v. 34, n. 2, p. 173-182, 2018. <https://doi.org/10.1080/08927014>.

RAKIC, M.; GRUSOVIN, M. G.; CANULLO, L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 31, n. 2, p. 359-68, 2016. doi: 10.11607/jomi.4150. Epub 2015 Oct 6. PMID: 26478978.

RAPHAEL C. Oral Health and Aging. **Am J Public Health**, v. 107, n. 1, p. 44-45, 2017. doi:10.2105/AJPH.2017.303835

REFAI, A. K.; TEXTOR, M.; BRUNETTE, D. M.; WATERFIELD, J. D. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **J Biomed Mater Res A**, v. 70, n. 2, p. 194-205, 2004. doi: 10.1002/jbm.a.30075. PMID: 15227664.

RENVERT, S.; PERSSON, G. R.; PIRIH, F. Q.; CAMARGO, P. M. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. **J Clin Periodontol**, v. 45, n. 20, p. 278-285, 2018. doi: 10.1111/jcpe.12956. PMID: 29926496.

RETAMAL-VALDES, B.; FORMIGA, M. C.; ALMEIDA, M. L.; et al. Does subgingival bacterial colonization differ between implants and teeth? A systematic review. **Braz Oral Res**, v. n. 33, p. 064, 2019. Published 2019 Sep 30. doi:10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0064

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

ROCA-MILLAN, E.; DOMÍNGUEZ-MÍNGER, J.; SCHEMEL-SUÁREZ, M.; ESTRUGO-DEVESA, A.; MARÍ-ROIG, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, J. Epstein-Barr Virus and Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 250, 2021. doi: 10.3390/v13020250. PMID: 33562820; PMCID: PMC7915238.

ROEHLING, S.; ASTASOV-FRAUENHOFFER, M.; HAUSER-GERSPACH, I.; BRAISSANT, O.; WOELFLER, H.; WALTIMO, T.; KNIHA, H.; GAHLERT, M. In vitro biofilm formation on titanium and zirconia implant surfaces. **J Periodontol**, v. 88, p. 298-307, 2017.

SACHDEO, A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Biofilms in the edentulous oral cavity. **J Prosthodont**, v. 17, n. 5, p. 348-356, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2008.00301.x>.

SAHRMANN, P.; GILLI, F.; WIEDEMEIER, D. B.; ATTIN, T.; SCHMIDLIN, P. R.; KARYGIANNI, L. The microbiome of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 661, 2020. doi: 10.3390/microorganisms8050661.

SAILER, I.; MÜHLEMANN, S.; ZWAHLEN, M.; HÄMMERLE, C. H.; SCHNEIDER, D. Cemented and screw-retained implant reconstructions: a systematic review of the survival and complication rates. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 6, p. 163-201, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02538.x. PMID: 23062142.

SAILER, I.; PHILIPP, A.; ZEMBIC, A.; PJETURSSON, B. E.; HÄMMERLE, C. H.; ZWAHLEN, M. A systematic review of the performance of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 4, p. 4-31, 2009. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01787.x

SAILER, I.; ZEMBIC, A.; JUNG, R. E.; SIEGENTHALER, D.; HOLDEREGGER, C.; HÄMMERLE, C. H. Randomized controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for canine and posterior single-tooth implant reconstructions: preliminary results at 1 year of function. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 3, p. 219-25, 2009. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01636.x. PMID: 19397632.

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

SALIHOGU, U.; BOYNUEGRI, D.; ENGIN, D.; DUMAN, A. N.; GOKALP, P.; BALOS, K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, p. 101-7, 2011.

SALVI, G. E.; COSGAREA, R.; SCULEAN, A. Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. **J Dent Res**, v. 96, p. 31-7, 2017.

SALVI, G. E.; FÜRST, M. M.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 3, p. 242-248, 2008. doi:10.1111/j.1600-0501.2007.01470.x

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

SÁNCHEZ, M. C.; FERNÁNDEZ, E.; LLAMA-PALACIOS, A.; FIGUERO, E.; HERRERA, D.; SANZ, M. Response to antiseptic agents of periodontal pathogens in in vitro biofilms on titanium and zirconium surfaces. **Dent Mater**, v. 33, n. 4, p. 446-453, 2017. doi:10.1016/j.dental.2017.01.013.

SANCHEZ, M. C.; LLAMA-PALACIOS, A.; FERNANDEZ, E.; FIGUERO, E.; MARIN, M. J.; LEON, R.; BLANC, V.; HERRERA, D.; SANZ, M. An in vitro biofilm model associated to dental implants: structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. **Dent Mater**, v. 30, p. 1161-71, 2014.

SANZ-MARTÍN, I.; SANZ-SÁNCHEZ, I.; CARRILLO DE ALBORNOZ, A.; FIGUERO, E.; SANZ M. Effects of modified abutment characteristics on peri-implant soft tissue health: A systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n. 1, p. 118-129, 2018. doi: 10.1111/clr.13097. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29072346; PMCID: PMC6084371.

SANZ-SÁNCHEZ, I.; SANZ-MARTÍN, I.; CARRILLO DE ALBORNOZ, A.; FIGUERO, E.; SANZ, M. Biological effect of the abutment material on the stability of peri-implant marginal

bone levels: A systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, Suppl 18, p. 124-144, 2018. doi:10.1111/clr.13293

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

SCHAUDINN, C.; GORUR, A.; KELLER, D.; SEDGHIZADEH, P. P.; COSTERTON, J. W. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. **J Am Dent Assoc**, v. 140, n. 8, p. 978–986, 2009.

SCHAUMANN, S.; STAUFENBIEL, I.; SCHERER, R.; et al. Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites. **BMC Oral Health**, v. 14, p. 157, 2014. Published 2014 Dec 17. doi:10.1186/1472-6831-14-157

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. doi:10.1128/AEM.01541-09

SCHWARZ, F.; HEGEWALD, A.; BECKER, J. Impact of implant-abutment connection and positioning of the machined collar/microgap on crestal bone level changes: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 4, p. 417-25, 2014. doi: 10.1111/clr.12215. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23782338; PMCID: PMC4232321.

SGOLASTRA, F.; PETRUCCI, A.; SEVERINO, M.; GATTO, R.; MONACO, A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 8-16, 2015. doi: 10.1111/clr.12319. Epub 2013 Dec 31. PMID: 24382358.

SILVA, T. S. O.; DE FREITAS, A. R.; DE ALBUQUERQUE, R. F.; PEDRAZZI, V.; RIBEIRO, R. F.; DO NASCIMENTO, C. A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: zirconia versus titanium abutments. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 22, n. 3, p. 301-310, 2020. <https://doi.org/10.1111/cid.12888>.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, p. 688-688, 1949.

SIPOS, R.; SZÉKELY, A.; RÉVÉSZ, S.; MÁRIALIGETI, K. Addressing PCR biases in environmental microbiology studies. **Methods Mol Biol**, v. 599, p. 37-58, 2010. doi:10.1007/978-1-60761-439-5\_3

SMALL, P. N.; TARNOW, D. P. Gingival recession around implants: a 1-year longitudinal prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 4, p. 527-532, 2000.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. J. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-144, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>.

SOLBIATI, J.; FRIAS-LOPEZ, J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. **J Dent Res**, v. 97, n. 5, p. 492-500, 2018. <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>.

SONG, X.; LI, L.; GOU, H.; XU, Y. Impact of implant location on the prevalence of peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis. **J Dent**, v. 103 p. 103490, 2020. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103490. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33007363.

STOKMAN MA, VAN WINKELHOFF AJ, VISSINK A, SPIJKERVET FK, RAGHOEBAR GM. Bacterial colonization of the peri-implant sulcus in dentate patients: a prospective observational study. **Clin Oral Investig**, v. 21, n. 2, p. 717-724, 2017. doi: 10.1007/s00784-016-1941-x. Epub 2016 Aug 24.

SUÁREZ-LÓPEZ DEL AMO, F.; YU, S. H. E.; WANG, H. L. Non-surgical therapy for peri-implant diseases: a systematic review. **J Oral Maxillofac Res**, v. 7, n. 3, e13, 2016.

SUÁREZ-LÓPEZ, F.; LIN, G. H.; MONJE, A.; GALINDO-MORENO, P.; WANG, H. L. Influence of Soft Tissue Thickness on Peri-Implant Marginal Bone Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Periodontol**, v. 87, n. 6, p. 690-9, 2016. doi: 10.1902/jop.2016.150571. Epub 2016 Jan 16. PMID: 26777766.

TETÈ, S.; MASTRANGELO, F.; BIANCHI, A.; ZIZZARI, V.; SCARANO, A. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, n. 1, p. 52-58, 2009.

TEUGHEL, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 2, p. 68-81, 2006. doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x. PMID: 16968383.

TOTOU, D.; NAKA, O.; MEHTA, S. B.; BANERJI, S. Esthetic, mechanical, and biological outcomes of various implant abutments for single-tooth replacement in the anterior region: a systematic review of the literature. **Int J Implant Dent**, v. 7, v. 1, p. 85, 2021. doi: 10.1186/s40729-021-00370-7. PMID: 34494174; PMCID: PMC8423965.

TSENG, S. P.; HUNG, W. C.; HUANG, C. Y. et al. 5-Episinuleptolide Decreases the Expression of the Extracellular Matrix in Early Biofilm Formation of Multi-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Mar Drugs**, v. 14, n. 8, p. 143, 2016. Published 2016 Jul 29. doi:10.3390/md14080143

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

VECHIATO-FILHO, A. J.; PESQUEIRA, A. A.; DE SOUZA, G. M.; DOS SANTOS, D. M.; PELLIZZER, E. P.; GOIATO, M. C. Are Zirconia Implant Abutments Safe and Predictable in Posterior Regions? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Prosthodont**, v. 29, n. 3, p. 233-44, 2016. doi: 10.11607/ijp.4349. PMID: 27148982.

VERDUGO, F.; CASTILLO, A.; CASTILLO, F.; et al.: Epstein–Barr virus associated peri-implantitis: a splitmouth study. **Clin Oral Investig**, v. 19, p. 535–43, 2015.

VETROMILLA, B. M.; BRONDANI, L. P.; PEREIRA-CENCI, T.; BERGOLI, C. D. Influence of different implant-abutment connection designs on the mechanical and biological behavior of single-tooth implants in the maxillary esthetic zone: A systematic review. **J Prosthet Dent**, v.

121, n. 3, p. 398-403, 2019. doi: 10.1016/j.prosdent.2018.05.007. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30477924.

VIGOLO, P.; ZACCARIA, M. Clinical evaluation of marginal bone level change of multiple adjacent implants restored with splinted and nonsplinted restorations: a 5-year prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 25, n. 6, p. 1189-94, 2010. PMID: 21197497.

WEBER, H. P.; KIM, D. M.; NG, M. W.; HWANG, J. W.; FIORELLINI, J. P. Peri-implant soft-tissue health surrounding cement- and screw-retained implant restorations: a multi-center, 3-year prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 4, 375-9, 2006. doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01232.x. PMID: 16907767.

XU, P.; GUNSOLLEY, J. Application of metagenomics in understanding oral health and disease. **Virulence**, v. , n. 3, p. 424-432, 2014. doi:10.4161/viru.28532

YAMANE, K.; AYUKAWA, Y.; TAKESHITA, T.; FURUHASHI, A.; YAMASHITA, Y.; KOYANO, K. Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, p. 1310-5, 2013.

YAMANO, S.; MA, A. K.; SHANTI, R. M.; KIM, S. W.; WADA, K.; SUKOTJO, C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 26, n. 6, p. 1247-1255, 2011.

YONG, X.; CHEN, Y.; TAO, R.; et al. Periodontopathogens and human  $\beta$ -defensin-2 expression in gingival crevicular fluid from patients with periodontal disease in Guangxi, China. **J Periodontal Res**, v. 50, n. 3, p. 403-410, 2015. doi:10.1111/jre.12220

YU, P.; WANG, C.; ZHOU, J.; JIANG, L.; XUE, J.; LI, W. Influence of Surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of *Streptococcus mutans* to Zirconia *In Vitro*. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 8901253, 2016. doi:10.1155/2016/8901253

ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. Towards optimized treatment outcomes for dental implants. **J Prosthet Dent**, v. 80, p. 639-40, 1998.

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

ZEMBIC, A.; KIM, S.; ZWAHLEN, M.; KELLY, J. R. Systematic review of the survival rate and incidence of biologic, technical, and esthetic complications of single implant abutments supporting fixed prostheses. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, p. 99-116, 2014. doi:10.11607/jomi.2014suppl.g2.2

ZITZMANN, N. U.; BERGLUNDH, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8, p. 286-91, 2008. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x. PMID: 18724856.



*Anexo*

---





## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

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



*Appendice*

---



## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

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

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

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

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

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

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

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

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



\_\_\_\_\_  
 PROF. DR. RICARDO FARIA RIBEIRO

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

E-mail:

\_\_\_\_\_  
 Cássio do Nascimento

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

E-mail:

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

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

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

\_\_\_\_\_  
 Sujeito da pesquisa

RG: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B - LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS NO DOUTORADO

1. **FREITAS, A. R.** ; DEL-REI, Y. C. ; SANTOS, E. S. ; RIBEIRO, R. F. ; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. F. ; do Nascimento, C. Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year longitudinal prospective study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2021 Apr;23(2):197-207.

DOI: [10.1111/cid.12978](https://doi.org/10.1111/cid.12978).

Fator de impacto: 3.932

2. SILVA, T. S. O. ; **FREITAS, A. R.** ; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. ; PEDRAZZI, V. ; RIBEIRO, R. F. ; DO NASCIMENTO, C. A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: Zirconia versus titanium abutments. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2020 Jun;22(3):301-310.

DOI: [10.1111/cid.12888](https://doi.org/10.1111/cid.12888).

Fator de Impacto: 3.932

3. SILVA, T. S. O. ; **FREITAS, A. R.** ; PINHEIRO, M. L. L. ; DO NASCIMENTO, C. ; WATANABE, E. ; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. F. . Oral Biofilm Formation on Different Materials for Dental Implants. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2018 Jun 24;(136):57756.

DOI: [10.3791/57756](https://doi.org/10.3791/57756)

Fator de Impacto: 1.355

4. **DE FREITAS, A. R.** ; SILVA, T. S. O. ; RIBEIRO, R. F. ; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. ; PEDRAZZI, V. ; DO NASCIMENTO, C. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. *Clinical Oral Investigations*, v. 22, p. 2335-2343, 2018.

DOI: [10.1007/s00784-018-2334-0](https://doi.org/10.1007/s00784-018-2334-0)

Fator de Impacto: 3.573

5. RAFFAINI, F. C. ; **FREITAS, A. R.** ; SILVA, T. S. O. ; CAVAGIONI, T. ; OLIVEIRA, J.F. ; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. ; PEDRAZZI, V. ; RIBEIRO, R. F. ; DO NASCIMENTO, C. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. *Biofouling*, v. 34, p. 173-182, 2018.






DOI: [10.1080/08927014.2017.1417396](https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1417396).

Fator de Impacto: 3.209

## **APÊNDICE C – ARTIGO REFERENTE À TESE**



# Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: Biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year longitudinal prospective study

Alice Ramos de Freitas DDS, MSc<sup>1</sup> | Yumi Chokyu Del Rey DDS<sup>1</sup>  |  
Emerson de Souza Santos MSc, PhD<sup>2</sup>  | Ricardo Faria Ribeiro DDS, MSc, PhD<sup>1</sup>  |  
Rubens Ferreira de Albuquerque Junior DDS, MSc, PhD<sup>1</sup>  |  
Cássio do Nascimento DDS, MSc, PhD<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, Molecular Diagnosis Laboratory, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Department of Clinical Toxicological and Bromatologic Analysis, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

## Correspondence

Cássio do Nascimento, Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, Molecular Diagnosis Laboratory, Av. Café s/n°, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil.  
Email: cassionasc@forp.usp.br

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Grant/Award Numbers: Processes 457941/2014-6, 163278/2015-6; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Grant/Award Number: Process 2014/22876-8

## Abstract

**Background:** Shifts in microbial communities are common over time, but they may disturb the host-microbiome homeostasis and result in inflammation of the peri-implant issues if a dysbiotic biofilm is established.

**Purpose:** Considering that different oral substrate surfaces may have a relevant impact on the microbial adhesion and colonization, the aim of this study was to investigate the microbial communities of the biofilm formed on single-implant restorations using titanium or zirconia abutments and how they correlate with clinical parameters after 3-years of implant loading.

**Materials and methods:** MiSeq sequencing of 16S rRNA amplicons was used to characterize the oral biofilms of individuals (n = 20) who were sampled longitudinally during 3 years of masticatory loading. Bioinformatics analysis and multivariate statistical analysis were used to evaluate the microbial diversity and clinical outcomes.

**Results:** Microbiomes of both abutment materials presented high alpha-diversity indices during all the experimental period, irrespective of the time of sampling. Microbial communities of titanium and zirconia were quite different over time, differing about 30% after 3 years of functional loading. Similarity of microbiomes between tested abutments and contralateral teeth was also low, ranging between 45% and 50% after 3 years of investigation. Periodontal pathogens commonly associated with peri-implantitis were found in both groups. Furthermore, both abutment materials presented strong correlations of diversity indices and microbial taxa with clinical outcomes.

**Conclusions:** The type of abutment substrate significantly influenced diversity and clustering of communities during 3 years of functional loading. The time of sampling had no effect on the variables. Large correlations were found between microbial findings and clinical outcomes.

## KEYWORDS

clinical assessment, dental implant, diagnosis, microbiology, oral biofilm, peri-implant mucositis/inflammation, prosthodontics

## 1 | INTRODUCTION

Infection resulting in an inflammatory process of the peri-implant tissues remains the major limitation to the long-term success of implant-supported restorations in dentistry. Implant failure frequently occurs as result of non-controlled microbial contamination.<sup>1,2</sup> The peri-implant surfaces, implant-related components, and supported prostheses are promptly colonized by microorganisms after oral exposure.<sup>3,4</sup> The initial biofilm seems to be quite influenced by the remained teeth in case of partially edentulous individuals.<sup>5</sup> Totally edentulous individuals also have an initial biofilm colonization similar to the one present before tooth loss.<sup>6</sup> However, substantial changes in the oral microbiota may occur over time. As biofilm matures, the extracellular matrix becomes more and more complex facilitating microbial growth and proliferation, resulting in microbial shift over time. Once the homeostasis between the host immune response and the microbial challenge is lost, peri-implantitis may occur as a consequence of the dysbiotic microbiome.<sup>7</sup>

Bacterial attachment and adhesion to different surfaces seems to be influenced by several factors, including surface topography, wettability, and chemical composition.<sup>8</sup> Molecular interactions resulted from surface free energy and differences in bacterial polarity also play a role, favoring or hindering the surface colonization. Hence, different materials employed for manufacturing implant components may influence the microbial adhesion and biofilm formation on dental implant assemblies.<sup>9</sup> The implant-abutment interface of two-piece implant systems is particularly prone to biofilm formation and microorganisms proliferation. Microgaps between implant and abutment can harbor bacterial species and allow the bi-directional leakage of microorganisms, fluids, and toxins through the interface. This process can lead to inflammatory responses in the peri-implant soft tissues, bone resorption and, ultimately, implant failure.<sup>10</sup>

Implant abutments are most commonly manufactured in titanium. Recently, zirconia has been introduced as an alternative material due to its better aesthetics properties, excellent resistance to corrosion, biocompatibility and high wear resistance.<sup>11</sup> Recent studies also showed lower susceptibility to early biofilm colonization of zirconia abutments compared to titanium.<sup>12,13</sup> Differences in the microbiome profile related to zirconia and titanium abutments were also demonstrated in short clinical investigations.<sup>14,15</sup> This suggests that the impact of substrate on the microbial communities can be specific, and that it changes with time during functional loading. Microbial communities are inherently dynamic and, as such, require longitudinal data from individuals. Since peri-implantitis incidence increases over time after implant placement,<sup>16</sup> it is fundamental to establish how the early microbial profile can reflect in the long-term colonization of implant-related surfaces. Understanding the long-term influence of abutment substrates on the biofilm formation, and how they correlate to the clinical parameters are of major importance to verify the reliability of zirconia abutments. Therefore, studies correlating the period of functional loading and type of abutment substrate with clinical and microbiological parameters are very interesting, assuming that the differences in structure of substrates support different microbial

### What is known:

- Metagenomic techniques can analyze the entire microbiome of complex biofilms, providing a comprehensive overview of microbial communities and its shifts over time.
- Few studies employed 16S rRNA sequencing to evaluate the biofilm formation around different abutment materials and its correlation with the clinical outcomes.

### What this study adds:

- This long-term prospective clinical trial used 16S rRNA sequencing to analyze the composition, diversity and similarity of microbiomes from titanium and zirconia abutments over a 3-year evaluation period.
- The abutment material impacted the bacterial shifting mainly during the first years of implant function and close correlations between microbial and clinical findings were found.

communities. Furthermore, few studies have used 16S rRNA sequencing for this purpose.

The aim of this study was to investigate the taxonomic profile of the biofilm formed on single-implant restorations using titanium or zirconia abutments and its correlation to clinical and radiological peri-implant conditions over a 3-year period. It was hypothesized that (1) species richness, diversity of their communities and number of operational taxonomic units (OTU) counts depend on the type of abutment substrate, (2) time of functional loading affects microbial communities similarly, and (3) clinical parameters of implant restorations are correlated with microbial findings.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study design and participants

This research consisted of an interventional longitudinal clinical study comparing two different abutment materials in participants who were intended to perform a rehabilitation treatment using single-unit implant-supported restorations. The study was conducted in the Clinics of Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, SP Brazil, which belongs to the University of São Paulo. The study protocol was approved by the local Ethics Committee for Clinical Trials under the process CAAE 0066.0.138.000-10 and all the experiments were undertaken with the informed and written consent of participants. The study was developed according to the CONSORT statements for reporting clinical trials. The trial was not registered because it started already by January 2010.

The main variable microbial count was used for sample size estimation. Comparing two independent groups (implants restored with titanium or zirconia abutments) with repeated measures considering time-series data and standard deviation of 1.26 and effect size of 1.12, the

sample size provided a statistical power of 96%, with a significance level of 5% (parameters were taken from similar studies of the research group). The study employed a single-blinded clustered quasi-experimental controlled design comprising 20 partially edentate participants (17 women and three men; mean-age 45.5 years; range 18–69 years). Participants were assigned into two groups ( $n = 10$ ) according to the abutment substrate: Group 1 (eight women and two men, mean age 47 years) was constituted by individuals who received a two-part dental implant with a Morse taper connection (Ankylos C/X, Dentsply) in the anterior area of maxilla and subsequently were restored with aesthetic pre-machined zirconia abutments (Ankylos Cercon Balance, Dentsply); and the Group 2 (nine women and one man, mean age 48 years) comprehended individuals who received the same implants in the posterior region of maxilla/mandible and were restored with pre-machined titanium abutments (Ankylos Regular Abutment C/X, Dentsply). All implants had a diameter of 3.5 mm and a length ranging from 8 to 17 mm depending on the anatomical conditions.

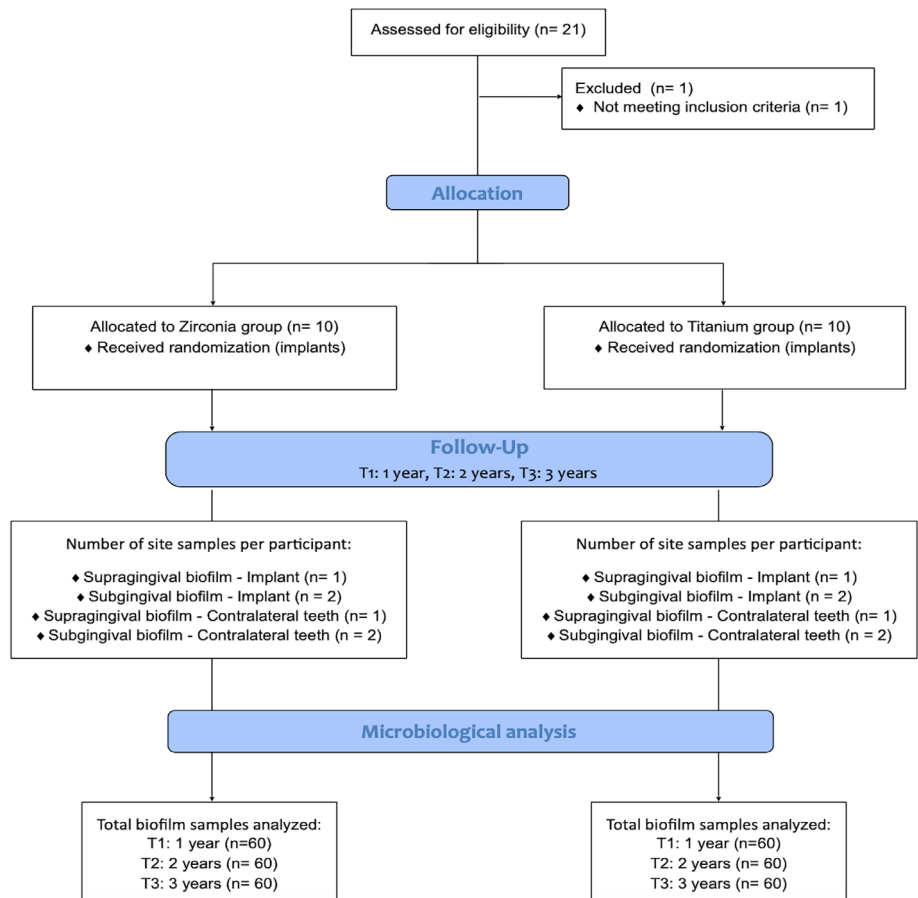
The inclusion criteria were as follows: (1) age  $\geq 18$  years; (2) individuals with good oral hygiene (regular maintenance) and without any history of smoking; (3) individuals indicative for cemented-retained single-unit implant-supported restoration in the anterior/posterior maxilla or posterior mandible; and (4) presence of contralateral and antagonists teeth. Exclusion criteria were as follows: (1) history of systemic conditions contraindicating minor oral surgery; (2) long-term nonsteroidal anti-inflammatory therapy; (3) oral bisphosphonate or

antibiotic therapies; (4) pregnancy or lactation; (5) inadequate bone volume; (6) unwillingness to return for the follow-up visits; and (7) teeth with an acute infection/inflammation.

Target DNA sequence analysis of the 16S rRNA gene coupled with Next-generation sequencing was used to explore microbial community dynamics from time-series data collected from the two different abutment materials and describe overall diversity. To track changes to the oral microbiota, data from supragingival and subgingival/submucosal biofilms were collected after 1, 2, and 3 years of functional loading of implant-supported restorations. Figure 1 illustrates the flow diagram of analyzed biofilm samples from all the included participants. Clinical parameters of probing depth, bleeding on probing and marginal bone loss were also investigated to be correlated with microbiological findings. Contralateral teeth were used as control for each substrate material while removing a lot of inter-individual variability from the estimated treatment effect. Annual recalls for supportive hygiene maintenance program and examinations were performed during study.

## 2.2 | Surgical procedures

Detailed description on the surgical and prosthetic procedures of this clinical trial were previously reported by in the literature.<sup>15</sup> Briefly, implants were placed at the level of the alveolar bone crest using a



**FIGURE 1** Study flow diagram of analyzed biofilm samples for participant-related group and time periods

two-stage surgical technique followed by attachment of the transmucosal healing abutments. Participants from group 1 received titanium abutments restored with metaloceramic crowns (cobalt-chrome alloy veneered with feldspathic porcelain) while participants from group 2 received zirconia abutments restored with all-ceramic crowns (CAD-CAM Lava Frame framework ceramic and Lava Ceram veneer ceramic, 3 M ESPE).

### 2.3 | Microbiological sampling

Supragingival and subgingival/submucosal biofilm samples from implants-restorations and their respective contralateral teeth were collected after 1 (T1), 2 (T2), and 3 years (T3) of functional loading. Cotton rolls were used to isolate all sampling areas from external contaminants. Supragingival biofilm was first harvested by rubbing surface crown of either implant-supported restoration or contralateral tooth using one sterile microbrush (spherical/regular size), constituting an individual implant/tooth sample. Following, the submucosal biofilm from peri-implant and the subgingival biofilm of their contralateral teeth were collected (twice) using six sterile paper points (#30) exposed during 30 s at the mesial, medial, and distal positions of buccal/palatal/lingual aspects. Each individual implant/tooth subgingival/submucosal sample was a pool of the six paper points. After harvesting, biofilm samples were immediately placed into microbes containing 150  $\mu$ l of TE buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) followed by addition of 150  $\mu$ l of 0.5 M NaOH. All the samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until laboratorial processing.

### 2.4 | Bacterial extraction and identification

Bacterial DNA extractions were performed using CTAB-DNA precipitation method (Corinaldesi and colleagues 2005).<sup>17</sup> After extraction, DNA was purified using QiAmp DNA mini kits (Qiagen, CA). Microbial inventories (24 libraries) were generated by amplifying the V3-V4 region of the 16S rRNA gene with universal primers (Reverse 803, 5' CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG CTA CCR GGG TAT CTA ATC C 3'; and Forward 347, 5' CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG ACG AGT GCG TGG AGG CAG CAG TRR GGA AT 3') on an Illumina MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, California).

Low-quality sequences, short fragments, and sequences derived from polyclonal amplification generated during the emPCR step were removed. Sequence data were processed, and demultiplexed in BaseSpace Sequence Hub using the default quality control parameters. Sequences were binned into OTUs Metagenomics RAST server (MG-RAST, version 3) at minimum sequence identify of 97%, and the longest sequence was picked as the cluster representative. A BLAT search for the cluster representative was then performed against the ITS, Greengenes, Silva LSU, M5RNA, RDP and Silva SSU databases. A minimum cutoff of 98% and maximum e-value cutoff of  $1 \times 10^{-5}$  were applied.<sup>18</sup> A minimum alignment length cutoff of 200 bp was used for analysis.

### 2.5 | Determination of alpha and beta diversity indices

Microbial diversity measurements were based on operational taxonomic units (OTUs) at genus level. Richness (measure of OTUs actually observed in samples), Margalef richness index and rarefaction curves were used to measure microbial richness. Microbial diversity based on Shannon–Wiener index and Simpson index were used to provide inference about the community composition of titanium and zirconia abutments, contemplating the relative abundances of different taxa harboring different substrates. Richness estimators Chao1 and Abundance-Based Coverage Estimator (ACE) have been calculated to estimate the total richness of a community from a sample, comparing estimates of rare genera across samples. Beta diversity was also estimated by similarity between different communities using Jaccard similarity distance.

### 2.6 | Periodontal pathogens investigation

The number of OTUs of the genera *Porphyromonas*, *Tannerella*, and *Treponema* were compared between groups over time. These genera comprised the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*, which are highly related to peri-implantitis.<sup>19</sup>

### 2.7 | Clinical parameters assessment

Probing depth and bleeding on probing were recorded from implant sites and teeth at the investigated periods by the same clinician and using an electronic periodontal probe (FP32, Florida Probe, USA), which allow a constant probing pressure of 15 g. Measurements were taken twice from mesial, medial, and distal in buccal and palatal/lingual aspects. The final measurement was a mean of the two evaluations. Peri-implant marginal bone levels were assessed by intra-oral radiographs at the mesial and distal sites. The vertical and horizontal marginal bone loss were measured using Image J Tool software (Version 3.00 for Windows, University of Texas Health Sciences Center), according to do Oliveira and colleagues.<sup>15</sup>

### 2.8 | Data analysis

The microbial diversity was evaluated using the number of taxa recorded within the evaluated groups. Significance of diversity differences between collection sites were sought by ANOVA followed by Tukey's Honest Significant Difference (HSD). To investigate how close each pair of sites is to one another, groups were clustered using the metric Jaccard distance. The influence of time of loading on the diversity was assessed by a linear model of regression. Brunner and Langer nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments was applied to compare counts of periodontal pathogens between

groups over time. Correlations between microbiological findings and clinical parameters were analyzed with Spearman's rank correlation coefficient ( $R_s$ ). It was assumed that OTUs counts have Poisson distributions while diversity indexes have normal distribution. Poisson is commonly used in the analysis of time-series data because they provide a flexible framework that can accommodate many autocorrelation structures. Statistical significance was set at  $p < .05$  level. All statistical analyses were performed using *vegan*, *ggpubr*, and *npard* on R Statistical Software v4.0.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Microbial diversity

The experimental design allowed to investigate how the oral microbiome of implants restored with either titanium or zirconia abutments changed over a 3-year period. Inferences on how OTUs within the microbial communities interacted with each other, as well as estimating how OTUs were affected by different substrates were performed.

A number of 180 biofilm samples were taken from both titanium and zirconia groups, totaling 360 biofilm samples. According to the Illumina 16S rRNA sequencing aggregate report, the total number of sequences generated by sequencing was 8 493 166 with a mean number of reads per library of 353 884. Altogether, 1346 bacterial OTUs were recorded in the sample set, capturing 589 named genera.

Observed OTUs within samples ranged from 0 to 149 914 (mean count of 506). Computation of OTUs counts and alpha diversity indices are summarized in Table 1. The microbial Richness, measure of the number of different kinds of microorganisms present in the investigated communities, varied between 365 (for subgingival biofilm from contralateral teeth of zirconia group at T3) and 459 (biofilm from supragingival biofilm from contralateral teeth of zirconia group at T1); Margalef index confirmed these results with the following values 45.97 (lowest diversity) and 60.34 (highest diversity). Submucosal samples from titanium group showed higher number of species when compared with zirconia group. However, the inverse was observed for supragingival samples, with the higher counts of species reported for zirconia group. As richness measurement is affected by a sample size, rarefaction curves were obtained to standardize all samples from different communities to a common number of sequences. Rarefaction confirmed differences observed on the richness pattern of titanium and zirconia groups. Also, communities from supragingival and subgingival biofilms of the contralateral teeth for both groups (titanium and zirconia) were more diverse than different abutment materials ( $p < 2 \times 10^{-16}$ ; ANOVA followed by Tukey's HSD—Figure 2). Shannon diversity index, which measures evenness and richness of communities within a sample, ranged between 2.88 and 3.58, indicating high alpha diversity for most samples. Shannon index from subgingival/submucosal samples of titanium group also presented the higher values when compared to zirconia. Simpson index ranged from 0.75 to 0.94, with the mean value of 0.94. A similar pattern was

observed for the Shannon and Simpson diversity indices but the magnitude of change differed for each index. Chao1 and ACE indices showed similar pattern and also presented differences between substrates. Chao1 ranged from 422.77 to 519.39 and ACE ranged from 420.77 to 503.92. Species richness and diversity significantly differed between substrates. Significance of differences are displayed in Table 2. However, no associations were observed between time of sampling and alpha diversity values as assessed by linear regression ( $p > .05$ ). Time had no effect on the diversity indices of communities.

Figure 3 illustrates the community similarity measured by Jaccard's similarity coefficient. This summarizes how much two sets of species overlap and is the number of species shared between two sites divided by the total number of species in both sites. The Jaccard does not take into account the abundance of the OTUs but rather relies on presence/absence of OTUs. As expected, the higher values of similarity were observed comparing samples from contralateral teeth of both groups (81%). The values of similarity for submucosal samples of titanium and zirconia were 62% at T1, 68% at T2, and 45% at T3. For supragingival samples, the similarity values were 62% at T1, 57% at T2, and 51% at T3. Overall, microbiota similarity of titanium and zirconia abutments reduced over time and differ about 50% after 3 years of functional loading. Titanium presented high similarity of microbiota with contralateral teeth at T1 (60% for supragingival and 62% for subgingival/submucosal biofilms). The microbiota similarity of titanium and its contralateral teeth decreased over time for submucosal biofilm. Time has impacted more effectively the submucosal microbiota. The values at T3 were 62% and 45%, respectively, for supragingival and submucosal biofilms. Conversely, supragingival microbiota of zirconia was significantly different from contralateral teeth during all the experimental time (49% at T1 and 56% at T3). Differently, the similarity of subgingival/submucosal microbiota was high at T1 (76%) remaining with similar values at T3 (62%).

#### 3.2 | Periodontal pathogens assessment

Wald-Type Statistic (WTS) and ANOVA-Type Statistic (ATS) from Brunner and Langer analysis showed significant differences in bacterial counts between groups along 3 years of functional loading. Overall, bacterial counts from supragingival and subgingival/submucosal biofilms increased after 3 years for both titanium and zirconia substrates. The  $P$  values were .0502 and .0001 for WTS and ATS, respectively. The between substrates comparisons showed significant differences for *Porphyromonas* from supragingival biofilm at T0 ( $p = .028$ ) and at T2 ( $p = .001$ ); *Tannerella* from supragingival biofilm at T2 ( $p = .002$ ) and submucosal biofilm at T3 ( $p = .001$ ); and *Treponema* from supragingival biofilm at T2 ( $p < .001$ ). In all comparisons, the higher counts were recorded for zirconia groups. The box plots illustrated in Figure 4 show the minimum, first quartile, median, third quartile, and the maximum distance of OTU counts measured for each time point separately. They indicate that the measured distances have a somewhat skewed distribution. The increase in median gives rise to a time effect on these selected species.

**TABLE 1** OTU counts and different diversity indices of bacteria on the biofilm samples

Collection sites	Index							
		Number of OTUs	Richness (S)	Margalef richness	Shannon (H')	Simpson	Chao1	ACE
Supragingival								
Titanium	T1	216 077	428	49.24	3.16	0.9076	470.50	459.97
	T2	274 586	426	48.16	3.15	0.8921	485.11	459.98
	T3	228 478	392	47.12	2.50	0.7756	439.51	429.21
Zirconia	T1	312 585	428	49.21	2.49	0.7514	509.35	484.60
	T2	117 184	367	46.32	2.88	0.8448	465.30	431.84
	T3	301 861	425	48.67	3.17	0.9005	445.02	446.43
Titanium contralateral teeth	T1	266 891	429	50.22	3.35	0.9296	490.03	474.12
	T2	395 858	437	52.33	3.17	0.8887	457.02	461.07
	T3	469 491	450	59.67	3.28	0.9056	519.39	490.53
Zirconia contralateral teeth	T1	542 025	436	52.11	3.19	0.9062	468.25	464.84
	T2	95 957	416	48.76	2.29	0.7774	473.60	468.46
	T3	291 908	365	45.97	3.06	0.8625	452.12	428.02
Subgingival								
Titanium	T1	179 024	432	50.67	3.27	0.9158	474.50	467.80
	T2	407 875	382	47.23	3.23	0.9143	424.38	425.60
	T3	227 726	446	58.57	3.32	0.9281	515.75	495.26
Zirconia	T1	365 752	454	60.19	3.51	0.9427	517.37	496.25
	T2	199 539	404	47.98	3.46	0.9437	438.07	444.86
	T3	336 973	421	49.68	2.97	0.8784	457.03	449.62
Titanium contralateral teeth	T1	314 367	433	51.79	3.63	0.9359	477.71	466.29
	T2	137 403	459	60.34	3.57	0.9419	516.18	503.92
	T3	509 321	456	60.17	3.30	0.9267	493.12	493.74
Zirconia contralateral teeth	T1	363 394	431	50.14	3.18	0.9135	461.44	460.61
	T2	364 768	395	49.03	3.35	0.9332	422.77	420.77
	T3	231 869	441	49.89	3.47	0.9417	473.62	466.85

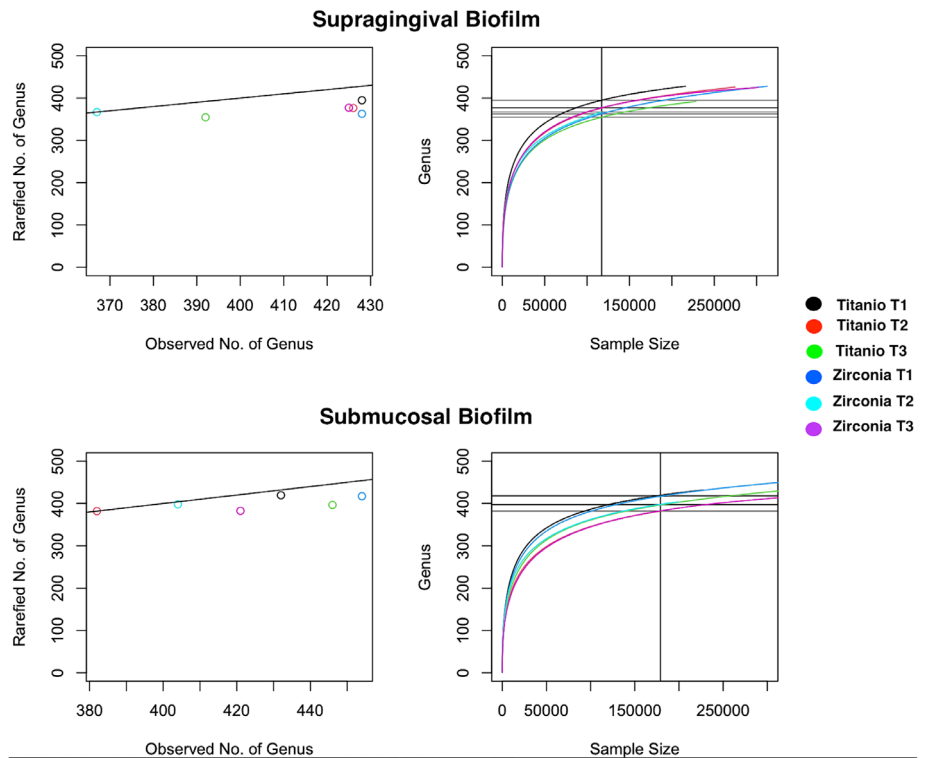
### 3.3 | Clinical outcomes and correlation with microbiological findings

In all of the participants enrolled in this study, no clinical complications (local infection, swelling, fistula, or peri-implant mucositis) were observed after 3-year follow-up. Probing depth on the titanium group increased significantly during the first year of loading while on the zirconia remained unaltered at the same period. The mean probing depth (mm,  $\pm$ SD) at baseline, T1, T2, and T3 were 1.80 (1.55), 3.52 (1.72), 2.78 (1.30), and 2.66 (1.25) for titanium; and 3.01 (1.68), 2.53 (0.69), 2.72 (0.81), and 2.16 (0.81) for zirconia. Bleeding on probing increased over time for both investigated substrates. Bleeding on probing (%) were 1.70 (baseline), 28.60 (T1), 42.90 (T2), and 23.80 (T3) for titanium; and 5.00 (baseline), 35.70 (T1), 31.00 (T2), and 33.30 (T3) for zirconia. The total marginal bone loss (mm,  $\pm$ SD) around dental implants restored with titanium or zirconia abutments after 3 years were  $0.99 \pm 0.41$  and  $0.76 \pm 0.21$ , respectively, with no significant

differences ( $p > .05$ ; ANOVA). No significant differences were observed between groups.

The correlation between diversity indices and clinical parameters in each group was performed using Pearson's correlation coefficient. Overall, submucosal biofilm presented large correlations with the clinical outcomes. Zirconia group showed large correlations with probing depth and bone loss while titanium showed large correlations with bleeding on probing. Relative abundance of the different taxa (Shannon and Simpson indices) and richness estimators (Chao1 and ACE indices) placed a greater weight on probing depth, whereas the richness impacted bleeding on probing and bone loss. Bleeding on probing and bone loss were significantly correlated in titanium group with correlation coefficient of .7905 and  $p$  value of .0128. No correlation was found between bleeding on probing and probing depth for either titanium or zirconia groups. All the correlation coefficients and respective  $p$  values are displayed in Table 3. Regarding the bacterial pathogens, correlations were found as follows: the genus *Tannerella* correlated with bleeding on

**FIGURE 2** Rarefied number of target genus and rarefaction curves of microbial Richness data for both titanium and zirconia-related communities



**TABLE 2** Significance of differences between titanium and zirconia substrates (ANOVA followed by Tukey's HSD)

Collection sites	Index	Index						
		Number of OTUs	Richness (S)	Margalef richness	Shannon (H')	Simpson	Chao1	ACE
Supragingival								
Abutment	T1	***	**	**	NS	NS	**	**
	T2	***	**	**	NS	NS	**	**
	T3	***	NS	NS	*	*	**	*
Contralateral teeth	T1	***	**	**	*	*	*	**
	T2	***	**	**	*	*	*	*
	T3	NS	**	**	*	*	NS	NS
Subgingival								
Abutment	T1	**	**	**	**	**	*	**
	T2	**	**	**	**	**	*	**
	T3	**	**	**	**	**	*	**
Contralateral teeth	T1	***	**	**	*	**	*	**
	T2	***	**	**	*	*	*	**
	T3	***	**	**	NS	*	*	**

\*  $p < .05$ .

\*\*  $p < .01$ .

\*\*\*  $p < .001$ .

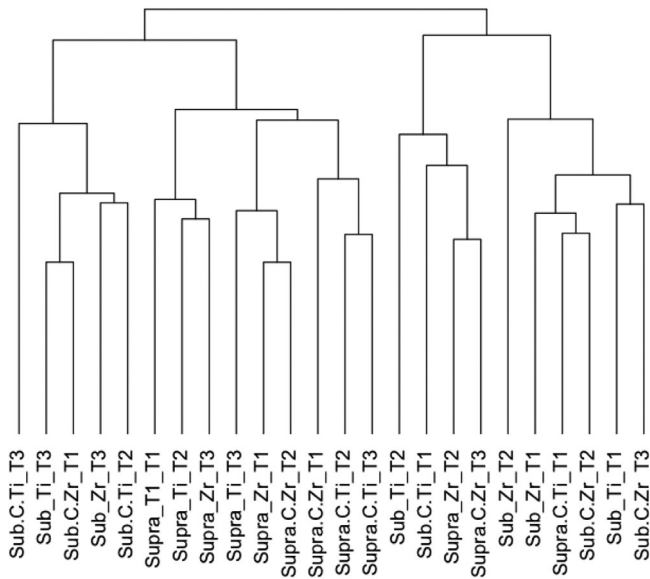
Abbreviations: HSD, honest significant difference; NS, no significance.

probing in titanium group ( $p$  value .0020, coefficient .9940) and with probing depth in zirconia group ( $p$  value .0053, coefficient .9624); the genus *Treponema* correlated with bleeding on probing in zirconia group ( $p$  value .0124, coefficient .9074); and the genus *Porphyromonas* correlated with bone loss in zirconia group ( $p$  value .0475, coefficient .7972).

## 4 | DISCUSSION

Peri-implant mucositis and peri-implantitis are conditions associated to the implant-supported restorations and increase over time due to biofilm accumulation.<sup>7</sup> The estimated prevalence of peri-implantitis

### Biofilm samples clustered by Jaccard similarity



**FIGURE 3** Dendrogram of communities similarity obtained from Jaccard coefficient. C, contralateral teeth; Sub, subgingival/submucosal biofilm; Supra, supragingival biofilm; T1, 1 year; T2, 2 years; T3, 3 years; Ti, titanium abutment; Zr, zirconia abutment

reaches values above 30% for peri-implantitis during 5 to 10 years after implant placement; and peri-implant mucositis may initiate at the earlier stages after implant placement reaching values of up to 60%.<sup>20,21</sup> Literature reports that approximately 1/3 of individuals using dental implants experienced peri-implantitis.<sup>22</sup> Peri-implant diseases result from the microbial imbalance and, if not controlled, may progress with bone resorption and lead to the implant loss.<sup>1,2</sup> The physicochemical characteristics of different substrate surfaces significantly impact the bacterial adhesion and colonization.<sup>23,24</sup> Titanium and zirconia abutments have been shown to present differences in the microbial profile of formed biofilm.<sup>14,15</sup> Thus, a more complete understanding of the resident microbial communities around implants restored with titanium or zirconia abutments, and the potential shifts occurring over time is primordial to improved biofilm control and reduction of peri-implant diseases. In this context, this prospective study applied 16S rRNA sequencing to investigate supragingival and submucosal biofilms associated to titanium or zirconia on the implant-supported restorations and correlate with clinical outcomes during 3 years of functional loading in healthy individuals.

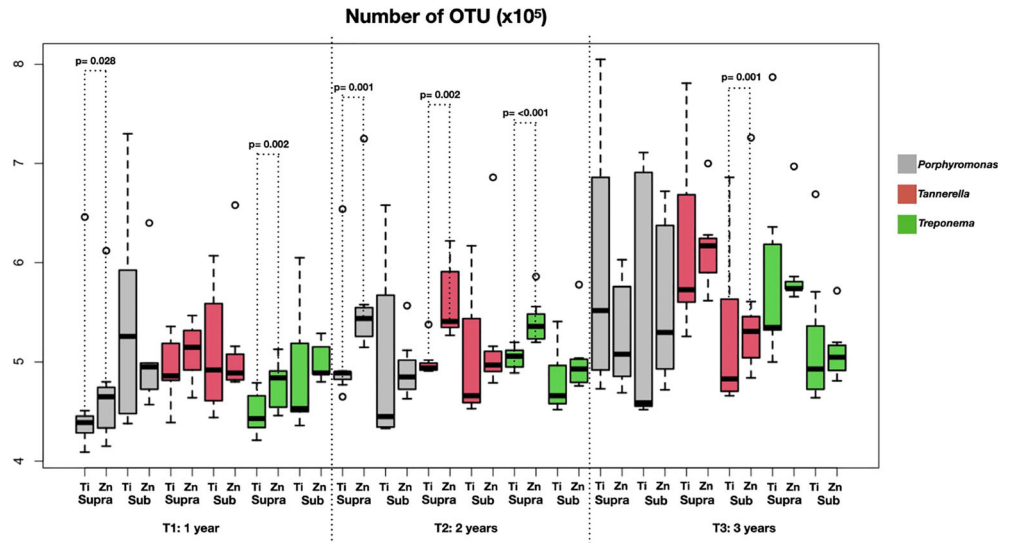
An important finding was that peri-implant microbiome was significantly influenced by the type of material used as abutment, and there is a correlation between microbial findings and clinical outcomes. Confirming the first hypothesis of the study, species richness, diversity of communities and number of OTU counts were straightly dependent on the type of abutment substrate. Both titanium and zirconia microbiomes presented high species richness and high levels of diversity in either supragingival or submucosal biofilms; microbial shifts occurred, but the values remained elevated over time. Our data

corroborates with the relevant literature regarding the peri-implant microbiota, in which sequencing studies commonly report the presence of a high microbial diversity in both healthy and diseased implants.<sup>25</sup> While the 16S rRNA sequencing allowed the identification of up to 589 different bacterial genera in this assessment, the mean average of detected genera on the different groups was 505. The clustering of sequences showed that similarity of supragingival and submucosal communities from different substrates increased during experimental period, reaching values near to 70% after 3 years. This result is quite interesting, meaning that substrate surface may have higher impact on the bacterial shifting during the first years of functional loading, which is positive since the literature shows it takes about 5 years for the peri-implantitis to progress and result in clinical complications.<sup>19</sup> The number of 589 genera reported and the levels of similarity between substrates are relevant, because they demonstrate that titanium and zirconia present a different pattern of microbial colonization, which may be related to physical and chemical characteristics of the surfaces.<sup>11</sup> Most studies on the literature reports that the microbiota colonizing dental implants are quite similar to that found in the surrounding teeth.<sup>7,8</sup> Differently, our results showed that similarity of microbiome of tested abutments and contralateral teeth ranged values between 45% and 50% after 3 years of investigation. Recent relevant literature corroborates with our findings; according to the study, the peri-implant and periodontal microbiomes represent microbiologically distinct ecosystems and proximity of implant and teeth not necessarily results in a similar microbial colonization.<sup>24,25</sup> The rationale for this difference may be related to the detection method. The 16S rRNA sequencing used in the present study allowed a massive bacterial sequencing, providing a more complete view of the oral microbiome, which is not possible using culture-dependent or hybridization techniques.

The study was classified as a quasi-experimental design because abutment materials could not be randomized. Titanium abutments were placed in the posterior area, while zirconia abutments were placed in the anterior area, following the manufacturer's instructions. In order to limit the effect of this limitation, both abutments types had similar dimensions and contralateral teeth were used as control to investigate potential differences on the microbial communities from anterior and posterior areas. Jaccard similarity index showed an overall similarity of 82% when comparing the microbiota of titanium and zirconia contralateral teeth, confirming that anterior or posterior area have not influenced the microbial profile. This result suggests that the substrate had a higher impact in the formed microbiota than the area of implant placement, corroborating with other studies.<sup>9,26</sup> In addition, aiming to minimize the influence of oral hygiene in the investigated microbiota, all the participants followed the same hygiene protocol established during the entire experimental study: tooth brushing three times/day and professional brushing every 6 months. None of the total 20 participants examined presented infectious or signals of advanced local inflammatory conditions in any time point of examination, with exception of the bleeding on probing. Also, the mean age of participants in both groups were similar, reducing potential biases related to this feature (Titanium:  $48 \pm 3.6$ ; Zirconia:  $47 \pm 4.2$ ; years-old, mean  $\pm$  SD).



**FIGURE 4** Median, maximum, and minimum values, upper and lower quartiles of the OTU counts ( $\times 10^5$ ) of periodontal pathogens detected on the supragingival and submucosal biofilms from implant-related sites (titanium and zirconia) over time



**TABLE 3** Pearson correlation test between clinical parameters and microbial diversity

		Probing depth Correlation		Bleeding on probing Correlation		Bone loss Correlation	
		Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
<b>Subgingival</b>							
Titanium	Species richness	0.1837	.7274	0.9994	<.0001*	0.8378	.0372*
	Shannon index	0.1929	.7155	0.9415	.0050*	0.5772	.2303
	Simpson index	0.5257	.2841	0.7622	.0780	0.2522	.6296
	Chao1 index	0.0731	.7850	0.9750	.0009*	0.6708	.1447
	ACE index	0.0076	.8089	0.9875	.0002*	0.7180	.1081
Zirconia	Species richness	0.8915	.0170*	0.5814	.2261	0.9432	.0047*
	Shannon index	0.6718	.1439	0.6316	.1785	0.0718	.8924
	Simpson index	0.5967	.2112	0.7039	.1185	0.1683	.7498
	Chao1 index	0.9358	.0060*	0.1299	.6892	0.9011	.0141*
	ACE index	0.9773	.0007*	0.3555	.4891	0.8278	.0418*
<b>Supragingival</b>							
Titanium	Species richness	0.6459	.1659	0.6579	.1555	0.1061	.8414
	Shannon index	0.7083	.1152	0.5917	.2160	0.0214	.9678
	Simpson index	0.1299	.6892	0.6130	.1956	0.0481	.9278
	Chao1 index	0.3275	.5263	0.8850	.0190*	0.4572	.3619
	ACE index	0.6071	.2012	0.6945	.1257	0.1554	.7687
Zirconia	Species richness	0.4241	.4019	0.9589	.0024*	0.9479	.0039*
	Shannon index	0.9524	.0033*	0.0988	.7641	0.4372	.3860
	Simpson index	0.9690	.0014*	0.0988	.8522	0.4905	.3232
	Chao1 index	0.9830	.0004*	0.0337	.9494	0.5463	.2620
	ACE index	0.4552	.3643	0.9485	.0039*	0.9583	.0025*

Note: \*Significant correlation.

The second hypothesis was partially rejected. The time of functional loading have not impacted microbial diversity on this study. Although the linear regression produced insignificant results of the time

effect on the microbial diversity, this could be due to the small sample size. Chao1 and ACE indices suggested that diversity decreased over time for supragingival samples of both abutment materials. These

indices seem to be more sensitive in this study since they evaluate the total richness of a community from a sample; they calculate expected OTUs based on observed OTUs. Chao1 estimator gives more weight to the low abundance taxa (rare genera). ACE estimator divides observed frequencies in abundant and rare taxa, and the estimation of the missing taxa is based entirely on the rare taxa.<sup>27</sup> The data sets were shown skewed toward the low abundance genera at the first year of evaluation. Thus, our results suggest that rare genera decrease over time for both substrates and may have no impact on the clinical complications. Conversely though, time had an effect on the bacterial counts between groups. Overall, bacterial counts increased after 3 years for both titanium and zirconia substrates, but with no significant effect on the clinical outcomes. Simpson index confirmed that communities had no dominant genera, which reflects the equilibrium of the oral microbiota during the experimental period. To date, the bacterial markers for periodontitis progression belonging to *Porphyromonas*, *Tannerella*, and *Treponema* genera were found in lower to moderate levels in both groups, with relatively high counts for zirconia substrate after 3 years of loading. The presence of these species in both abutment materials may suggest that they are only pathogenic when the bacterial balance is disturbed or when there is host susceptibility. Our data confirm that biofilms may harbor typical oral microorganisms along with potential pathogens. Literature shows that in most of periodontal healthy individuals the biofilm harbors periodontal pathogens in moderate to high levels, similar to those found in periodontal diseases.<sup>27</sup> Recently, a systematic review on the peri-implant microbiome reported no substantial and consistent differences in the prevalence of specific microbial species between health and disease; nevertheless, studies using sequencing/pyrosequencing methods have demonstrated a higher prevalence of periodontal pathogens are detected in inflamed or diseased implants.<sup>23</sup>

The third hypothesis of the study was also confirmed. As expected, submucosal biofilm presented large correlations with the clinical outcomes. We demonstrated close correlations with clinical findings for either diversity indices or periodontal bacterial counts. Titanium was not correlated with probing depth, while zirconia was not correlated with bleeding on probing and bone loss. Diversity indices correlated with probing depth, whereas the species richness was more associated to bleeding on probing and bone loss. The correlation findings presented a skewed distribution, which could reflect the selective role of each material, suggesting that disruption of oral biofilm balance may represent a potential risk for developing peri-implant diseases such as peri-mucositis and peri-implantitis. The correlations might suggest an underlying causal relationship between compared variables, however, results should be interpreted with caution; since we have applied a quasi-experimental controlled design without randomization of abutments allocation, values of correlations could be the result of random chance or influenced by another hidden variable. Determining causality of titanium- and zirconia-related microbiota on the clinical outcomes should be further investigated in randomized controlled long-term studies.

This study highlights the microbial changes that occurs in the oral microbiome associated to different materials on the implant-

supported restorations over time, and the importance of monitoring clinical outcomes. Also, the results reveal new insights into titanium and zirconia substrates upon the oral microbiome and has important implications for future studies exploring relationships between the oral microbiome, surface characteristics and clinical outcomes.

## 5 | CONCLUSION

The microbiome of biofilm formed on the implant-supported restorations was significantly influenced by the type of material used as abutment. Titanium and zirconia presented differences in terms of species richness, diversity and OTU counts. The similarity of communities from different substrates increased over time, but remained significantly different after 3 years of loading. Implant-related microbiomes were quite different from microbiome of remaining teeth. Time of loading did not influence diversity metrics, but showed a positive relation with the bacterial counts, which increased over time. The correlations found might suggest an underlying causal relationship between microbial findings and clinical outcomes.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo—FAPESP (Process 2014/22876-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Processes 457941/2014-6 and 163278/2015-6). The authors would like to thank Prof. Dr. Sérgio Akira Uemura of the Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP for the support.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yumi Chokyu del Rey: data analyses/interpretation; drafting article; critical revision of article; editing; final approval of article. Alice Ramos de Freitas: data collection; data analyses/interpretation; critical revision of article; final approval of article. Emerson de Souza Santos: data analyses/interpretation; critical revision of article; final approval of article. Ricardo Faria Ribeiro: concept/design; funding acquisition; project administration; critical revision of article; final approval of article. Rubens Ferreira de Albuquerque Junior: data analyses/interpretation; critical review of article; final approval of article. Cássio do Nascimento: concept/design; data analyses/interpretation; statistics; funding acquisition; project administration; drafting article; critical revision of article; editing; final approval of article.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data available on request from the authors: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ETHICS STATEMENT


Approval for this study was obtained from the School of Dentistry of Ribeirão Preto (CAAE 0066.0.138.000-10), and all the experiments were undertaken with the informed and written consent of each participant.

## ORCID

Yumi Chokyu Del Rey  <https://orcid.org/0000-0002-2833-8842>

Emerson de Souza Santos  <https://orcid.org/0000-0002-3544-6745>

Ricardo Faria Ribeiro  <https://orcid.org/0000-0003-4211-0542>

Rubens Ferreira de Albuquerque Junior  <https://orcid.org/0000-0003-2016-1752>

Cássio do Nascimento  <https://orcid.org/0000-0002-2220-0148>

## REFERENCES

- Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):e8-e16. <https://doi.org/10.1111/clr.12319>.
- Carrasco-García A, Castellanos-Cosano L, Corcuera-Flores J-R, Rodríguez-Pérez A, Torres-Lagares D, Machuca-Portillo G. Influence of marginal bone loss on peri-implantitis: systematic review of literature. *J Clin Exp Dent.* 2019;11(11):e1045-e1071. <https://doi.org/10.4317/jced.56202>.
- Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):25-37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01194.x>.
- Quirynen M, van Assche N. Microbial changes after full-mouth tooth extraction, followed by 2-stage implant placement. *J Clin Periodontol.* 2011;38(6):581-589.
- Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Rutger Persson G. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01197.x>.
- Sachdeo A, Haffajee AD, Socransky SS. Biofilms in the edentulous oral cavity. *J Prosthodont.* 2008;17(5):348-356. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2008.00301.x>.
- Solbiati J, Frias-Lopez J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease. *J Dent Res.* 2018;97(5):492-500. <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>.
- Oh JK, Yegin Y, Yang F, et al. The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion. *Sci Rep.* 2018; 8(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1>.
- Hahnel S, Wieser A, Lang R, Rosentritt M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(11):1297-1301. <https://doi.org/10.1111/clr.12454>.
- Pita MS, do Nascimento C, dos Santos CGP, Pires IM, Pedrazzi V. Experimental conical-head abutment screws on the microbial leakage through the implant-abutment interface: an in vitro analysis using target-specific DNA probes. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(7):e68-e75. <https://doi.org/10.1111/clr.12876>.
- Linkevicius T, Vaitelis J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26:139-147. <https://doi.org/10.1111/clr.12631>.
- Raffaini FC, Freitas AR, Silva TSO, et al. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. *Biofouling.* 2018;34(2):173-182. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1417396>.
- Clever K, Schlegel KA, Kniha H, et al. Experimental peri-implant mucositis around titanium and zirconia implants in comparison to a natural tooth: part 2—clinical and microbiological parameters. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018;48(4):560-565. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.10.017>.
- do Nascimento C, Pita MS, Santos EDS, et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent Mater.* 2016;32(1):93-101. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.014>.
- de Oliveira Silva TS, de Freitas AR, de Albuquerque RF, Pedrazzi V, Ribeiro RF, do Nascimento C. A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: zirconia versus titanium abutments. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2020;22(3):301-310. <https://doi.org/10.1111/cid.12888>.
- Dreyer H, Grischke J, Tiede C, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review. *J Periodontol Res.* 2018;53(5): 657-681. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>.
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2000;71(1):46-50. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.46-50.2005>.
- Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods.* 2013;10(10):996-998.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RLJ. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>.
- Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(Suppl 6):67-76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x>.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
- Kordbacheh Changi K, Finkelstein J, Papapanou PN. Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: a study of electronic health records at a U.S. dental school. *Clin Oral Implants Res.* 2019;30(4):306-314. <https://doi.org/10.1111/clr.13416>.
- Hao Y, Huang X, Zhou X, et al. Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3157. <https://doi.org/10.3390/ijms19103157>.
- Sahrmann P, Gilli F, Wiedemeier DB, Attin T, Schmidlin PR, Karygianni L. The microbiome of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Microorganisms.* 2020;8(5):661.
- Dabdoub SM, Tsigarida AA, Kumar PS. Patient-specific analysis of periodontal and peri-implant microbiomes. *J Dent Res.* 2013;92(12 Suppl):168S-175S.
- de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, de Assis Mollo F, Salih V. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. *Materials.* 2014;7(5):3651-3662. <https://doi.org/10.3390/ma7053651>.
- Kim B-R, Shin J, Guevarra R, et al. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(12):2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>.

**How to cite this article:** de Freitas AR, Del Rey YC, de Souza Santos E, Faria Ribeiro R, de Albuquerque Junior RF, do Nascimento C. Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: Biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year longitudinal prospective study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2021;23:197–207. <https://doi.org/10.1111/cid.12978>