



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



VICTOR BARBOZA DA MATA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO AFROUXAMENTO DE PARAFUSOS DA
INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA INTERFACE IMPLANTE/PILAR
PROTÉTICO APÓS APLICAÇÃO DE CARGA EM IMPLANTES CONE
MORSE**

RIBEIRÃO PRETO

2022

VICTOR BARBOZA DA MATA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO AFROUXAMENTO DE PARAFUSOS DA
INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA INTERFACE IMPLANTE/PILAR
PROTÉTICO APÓS APLICAÇÃO DE CARGA EM IMPLANTES CONE
MORSE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências - Programa:
Odontologia (Reabilitação Oral).

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

VERSÃO ORIGINAL

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Mata, Victor Barboza da,

Avaliação *in vitro* do afrouxamento de parafusos e da infiltração bacteriana na interface implante/pilar protético após aplicação de carga em implantes cone Morse.

134p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Cássio do Nascimento.

Versão Original

1. Implante Dentário. 2. Conexão Implante Dentário-Pivô. 3. Conectores Protéticos. 4. Microbiologia .5. Torque.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mata VB. Avaliação *in vitro* do afrouxamento de parafusos e da infiltração bacteriana na interface implante/pilar protético após aplicação de carga em implantes cone morse

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

Área de concentração: Reabilitação Oral

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a **Deus** por ser esse Pai tão bondoso, cuidadoso, misericordioso e ter permitido que esse sonho se concretizasse. Obrigado todos os momentos que Se fez presente segurando minha mão, lutando minhas lutas e vibrando minhas vitórias.

Obrigado, papai!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Cleverson Arêdes da Mata** (papai) e **Andréa Barboza da Mata**, por sonharem os meus sonhos e batalharem arduamente para que tudo em minha vida fosse possível. Obrigado por tantas horas de trabalho dedicado as minhas necessidades, por ser meu colo nos dias difíceis e porto seguro. Essa conquista é nossa! Obrigado por sempre acreditarem em mim, sem vocês eu jamais teria chegado até aqui. Só amando muito para fazer tudo o que vocês fizeram e fazem. Amo vocês com todas as minhas forças!

A **vovó Sônia**, obrigado por ser essa avó parceira de todas as horas e vibrar com minhas conquistas como nenhuma outra pessoa faz. Nós conseguimos vovó!

A minha irmã, **Leticia Barboza da Mata** por todo carinho, cuidado e amor. Obrigado por acreditar nos meus sonhos e ser minha amiga de todos os momentos.

Aos meus **tios** por me amarem como filho, sem vocês esse sonho não seria possível.

Ao meu namorado, **João Vitor**, que sempre me apoiou e também se tornou meu porto seguro. Obrigado por sempre me acalmar, incentivar e ser tão presente, me ajudando de forma direta e indireta na construção dessa dissertação. Seu amor e carinho são fundamentais na minha vida.

Aos **professores** que passaram e fizeram parte da minha formação educacional, desde a pré-escola até os dias atuais, obrigado pela colaboração na construção do meu conhecimento.

Aos amigos de jornada **Andrezza Moura, Brenda Gonçalves, Allan Oliveira, Alia Houch, Murilo Campos, Thais Vinha, Millena Rocha**, por toda amizade e cuidado durante esses anos.

Ao meu amigo **Daniel Zuluaga** por ter compartilhado a experiência de morar em Ribeirão Preto e fazer parte dessa pesquisa. Obrigado por tantas horas dedicadas à realização desse trabalho, toda paciência e sempre proporcionar um ambiente de harmonia e calma, me ensinado a ser paciente e perseverante.

A **Livia Fiorin** por ter sido minha irmã de Fé durante esses anos, segurando minha mão durante a caminhada e nunca ter medindo esforços para me ajudar. A sua doçura e cuidado foram essenciais nesse história!

A minha amiga **Carol Fortes** por todos os momentos de cumplicidade, risadas, choros, conselhos, pelas longas conversas na companhia do nosso gellato preferido e também por sonhar acordada junto comigo, visualizando e acreditando que vamos vencer/somos vencedores.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional incalculáveis.

Aos **professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**. Um agradecimento especial à professora **Alma Blásida Concepcion Elizaur Benitez Catirse**, por ter me ensinado que ensinar não é apenas transmitir conhecimentos. Ao professor **Ricardo Faria Ribeiro** por todo auxílio na condução da pesquisa e à professora e coordenadora da pós-graduação **Andréa Cândido dos Reis** pelo legado que vem deixando no programa.

Aos **funcionários** de todos os setores que dedicam suas vidas ao funcionamento da Universidade. Um agradecimento especial ao **Wagner Del Gatto** que em diversos momentos me ajudou com muita boa vontade e atenção. Profissionais assim são joia rara.

À técnica do Laboratório, Dra. **Viviane de Cássia**, por todo auxílio e disponibilidade na execução da pesquisa. E à técnica, Dra. **Adriana Cláudia Lapria Faria de Queiroz**.

Ao meu orientador Dr. **Cássio do Nascimento**, obrigado por humanizar o processo, pela paciência e cordialidade. Obrigado por todo suporte na execução desse estudo.

Aos **professores** da banca examinadora pelo tempo disponibilizado para o presente trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro aos projetos Pós-Graduação em Odontologia (Reabilitação Oral) e pela bolsa de estudos concedida durante parte do mestrado.

À **FAPESP** pelo suporte financeiro para desenvolvimento da pesquisa.

Ao fabricante **Singular Implants** pela doação do implantes e pilares utilizados no estudo.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que colaboraram para a concretização desse projeto.

“Quem faz o que ninguém fez, vai experimentar aquilo que ninguém nunca experimentou!”
Provérvio da cultura Yorubá

RESUMO

RESUMO

Mata VB. **Avaliação *in vitro* do afrouxamento de parafusos e da infiltração bacteriana na interface implante/pilar protético após aplicação de carga em implantes cone morse** [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento mecânico de pilares Tibase 4 CAD, UCLA Co-Cr e Pilar Universal com conexão cone morse em implantes cônicos e cilíndricos, no que tange à perda de torque e infiltração microbiana antes e após ensaio de aplicação de carga cíclica, tendo a saliva humana como meio contaminante. Foram confeccionados 56 corpos de prova divididos nos grupos CMC TB (14 Implantes Cilíndricos/14 Pilares Ti-Base), CMX TB (14 Implantes Cônicos/14 Pilares Ti-Base), CMX PU (14 Implantes Cônicos/14 Pilar Universal) e CMX U (14 Implantes Cônicos/14 Pilares UCLA). A análise de perda de torque e teste de contaminação do interior dos implantes foi realizada antes e após ciclagem mecânica (2.000.000 ciclos com frequência de 5 Hz e 120 N). Para avaliação da contaminação microbiana foi realizado análise das amostras pela técnica *Checkerboard* DNA-DNA Hybridization. A normalidade dos dados foi verificada pela inspeção visual dos gráficos de densidade, histogramas e Q-Q plots, e confirmados pelo teste de significância de Shapiro-Wilk. A homoscedasticidade foi verificada pelo teste de Levene. Os dados referentes aos ensaios de afrouxamento dos parafusos foram analisados pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. A análise do efeito dos pilares e ensaios de termociclagem e carga cíclica sobre a contagem de micro-organismos foi realizada pelo método não-paramétrico e multifatorial de Brunner-Langer (Brunner, 2002). Os grupos investigados apresentaram diferenças significantes nos valores de perda de torque (ANOVA - seguido por teste de Tukey; $p < 0,005$). Após o ensaio de termociclagem e carga cíclica o grupo CMC TB teve a maior porcentagem de afrouxamento do parafuso (79,37%), seguido pelos grupos CMX U e CMX PU, respectivamente, com taxas de 68,57 e 43,18%. O melhor desempenho entre os grupos foi do grupo CMX TB, que apresentou uma taxa de 24,00% de afrouxamento dos parafusos, além disso, os conjuntos implantes/pilares de todos os pilares investigados apresentaram a passagem de micro-organismos por meio da interface de conexão dos componentes, o mesmo foi observado para os pilares que foram submetidos somente ao ensaio térmico. Os grupos investigados apresentaram diferenças significantes nos valores de contaminação (ANOVA; $p < 0,005$). Os menores valores registrados entre os grupos termociclagem e carga cíclica foi o grupo CMX U, enquanto os grupos CMC TB e CMX TB apresentaram os maiores valores (Tukey; $p < 0,005$). Entre os grupos da termociclagem o que apresentou melhor resultado também foi o grupo CMX U. Com base nos resultados obtidos pelo desenho experimental proposto, pode-se concluir que o afrouxamento do parafuso do pilar protético e a infiltração de micro-organismos para o interior do implante ocorreu em todos os pilares estudados, com ou sem a simulação de carga cíclica, nos grupos com aplicação de carga cíclica, foram observados os maiores valores de perda de torque e de contagem de micro-organismos no interior dos implantes, o grupo CMX TB apresentou a menor taxa de afrouxamento, e o grupo CMX U apresentou as menores contagens de micro-organismos provenientes do interior dos implantes.

Palavras chave: Implante Dentário. Conexão Implante Dentário-Pivô. Conectores Protéticos. Microbiologia. Torque.

ABSTRACT

ABSTRACT

Mata VB. **In vitro evaluation of screw loosening and bacterial infiltration at the implant/prosthetic abutment interface after load application on morse taper implants** [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto; 2022.

The objective of this study was to evaluate the mechanical behavior of Tibase 4 CAD, UCLA Co-Cr and Universal Abutment with Morse taper connection in conical and cylinder implants, regarding the loss of torque and microbial infiltration before and after load application test cycle, with human saliva as the contaminating medium. Fifty-six specimens were prepared, divided into groups CMC TB (14 Cylindrical Implants/14 Ti-Base Abutments), CMX TB (14 Conical Implants/14 Ti-Base Abutments), CMX PU (14 Conical Implants/14 Universal Abutment) and CMX U (14 Tapered Implants/14 UCLA Abutments). The analysis of loss of torque and contamination test inside the implants was performed before and after mechanical cycling (2,000,000 cycles with a frequency of 5 Hz and 120 N). To assess microbial contamination, samples were analyzed using the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique. Data normality was reviewed by visual inspection of density graphs, histograms and Q-Q plots, and confirmed by Shapiro-Wilk significance test. Homoscedasticity was verified by Levene's test. Data from screw loosening tests was analyzed using the ANOVA test followed by multiple Tukey's comparison tests. The analysis of the effect of the abutments, thermocycling and cyclic load assays on the microorganism count was done using the non-parametric and multifactorial method of Brunner-Langer (Brunner, 2002). The investigated groups showed significant differences in torque loss values (ANOVA - followed by Tukey's test; $p < 0.005$). After the thermocycling and cyclic load test, the CMC TB group had the highest percentage of screw loosening (79.37%), followed by the CMX U and CMX PU groups, respectively, with rates of 68.57 and 43.18%. The best performance between the groups was for the CMX TB group, which presented a rate of 24.00% of screw loosening. In addition, the implant/abutment sets of all abutments investigated showed the passage of microorganisms through the interface connection of the components, which was also observed for the columns that were submitted only to the thermal test. The investigated groups showed significant differences in the contamination values (ANOVA; $p < 0.005$). The lowest registered values between the thermocycling and cyclic load groups was the CMX U group, while the CMC TB and CMX TB groups presented the highest values (Tukey; $p < 0.005$). Among the thermocycling groups, the best result was presented by the CMX U group. Based on the results obtained by the proposed experimental design, it can be concluded that the loosening of the prosthetic abutment screw and the infiltration of microorganisms into the interior of the implantation occurred in all abutments studied, with or without the simulation of cyclic load, furthermore, in the groups with application of cyclic load, the highest values of torque loss and microorganism count inside the implants were observed, the CMX TB group showed the lowest rate of loosening, and the CMX U group had the lowest counts of microorganisms from inside the implants.

Keywords: Dental Implant. Dental Implant-Pivot Connection. Prosthetic Connectors. Microbiology. Torque

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Delineamento experimental do estudo.....	58
Figura 2 -	Pilar Base Tibase 4 CAD conectado ao implante Cone Morse.....	60
Figura 3 -	Pilar Universal conectado ao implante Cone Morse.....	60
Figura 4 -	Pilar UCLA conectado ao implante Cone Morse.....	61
Figura 5 -	Pilar protético recebendo aplicação de força com torquímetro digital	62
Figura 6 -	Conjuntos pilar/implante embutidos no poliuretano.....	62
Figura 7 -	A) Projetor de perfil e B) Impressora 3D Phrozen.....	63
Figura 8 -	Coroa no formato de canino superior em resina pela técnica de impressão 3D.....	63
Figura 9 -	Saliva coletada dos participantes.....	64
Figura 10 -	Aplicação de saliva no interior do corpo de prova.....	66
Figura 11 -	Corpos de prova posicionados com saliva, isolados do meio externo com <i>Parafilm</i>	66
Figura 12 -	Pistões da máquina de fadiga mecânica com aplicadores de força posicionados ao longo eixo das coroas.....	67
Figura 13 -	Coleta de amostras do interior do implante após termociclagem e carga cíclica.....	68
Figura 14 -	Amostra coletada e armazenada para análise microbiológica.....	69
Figura 15 -	Micro tubos fervidos a 95°C	71
Figura 16 -	Microtubos resfriados	72
Figura 17 -	Aplicação das amostras de DNA sobre a membrana de <i>nylon</i> posicionada no interior do <i>Minislot</i>	72
Figura 18 -	Bomba a vácuo conectada ao <i>Minislot 30</i>	73
Figura 19 -	Solução contendo NaCl 1 M e <i>Blocking reagent</i> diluídos em 30 mL de <i>Hybridization Buffer reagent</i>	74
Figura 20 -	Aplicação da solução na membrana para pré-hibridização.....	74

Figura 21 -	Membranas embaladas em invólucro de plástico prontas para a pré-hibridização.....	75
Figura 22 -	Aplicação das sondas de DNA genômico das 40 espécies selecionadas para o estudo nas canaletas do <i>Miniblotter</i> 45.....	76
Figura 23 -	Aparelho <i>Miniblotter</i> 45 envolvido em filme PVC para evitar o ressecamento da membrana no forno de hibridização	76
Figura 24 -	Forno de hibridização e agitação.....	77
Figura 25 -	Membranas prontas para a exposição.....	78
Figura 26 -	Membrana posicionada para exposição em cassete de autorradiografia.....	78
Figura 27 -	Radiografia após exposição e revelação.....	79
Figura 28 -	Filme radiográfico analisado no software CLIQS	80
Figura 29 -	Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil da quantificação de genomas totais das 40 espécies-alvo identificadas nas roscas do parafuso e interior do implante dos grupos submetidos ao carregamento cíclico (D) e a termociclagem (T).....	85
Figura 30 -	Contagem de bactérias (genomas totais) após o ensaio de carga cíclica (Grupo térmico com carga cíclica).....	93
Figura 31 -	Contagem de bactérias (genomas totais) após o ensaio de carga cíclica (Grupo térmico).....	94
Figura 32 -	Ilustração gráfica da contagem de microrganismos ($\times 10^5$) detectados na saliva dos doadores antes e após o ensaio de ciclagem de carga.....	127
Figura 33 -	Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil da quantificação de genomas totais das 40 espécies-alvo identificadas na saliva inicial e final.....	128
Figura 34 -	Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil identificadas na saliva.....	128

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores referentes ao torque, retorque, destorque e porcentagem de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos do grupo CMC TB 4 CAD....	83
Tabela 2-	Valores referentes ao torque, retorque, destorque e porcentagem de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos do grupo CMX TB 4 CAD....	83
Tabela 3-	Valores referentes ao torque, retorque, destorque e porcentagem de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos do grupo CMX PU.....	83
Tabela 4-	Os valores referentes ao torque, retorque, destorque e porcentagem de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos do grupo CMX U.....	84
Tabela 5-	Médias de perda de torque.....	84
Tabela 6-	Grupo CMC TB.....	86
Tabela 7-	Grupo CMX TB.....	88
Tabela 8-	Grupo CMX PU.....	90
Tabela 9-	Grupo CMX U.....	92

LISTA DE SIMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
×	Vezes ou por
±	Mais ou menos
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celsius
mm	Milímetro
μm	Micrometro
s	Segundos
min	Minuto
h	Hora
p	Probabilidade de significância
Ncm	Newton por centímetro

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	43
2. PROPOSIÇÃO.....	51
2.1 Objetivo geral.....	53
2.2 Objetivo específico	53
2.3 Hipótese.....	53
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 Delineamento experimental	57
3.2 Seleções dos implantes e pilares e constituição dos grupos de estudo.....	58
3.3 Coleta de controle negativo e fixação dos pilares aos implantes	59
3.3.1 <i>Obtenção das bases de poliuretano e posicionamento dos implantes e pilares protéticos</i>	61
3.4 Confeção das coroas 3D	62
3.5 Coleta da saliva	64
3.6 Preparo final dos copos de prova e Teste de Contaminação.....	64
3.7 Ensaio de termociclagem e carregamento cíclico	65
3.7.1 <i>Obtenção de dados da perda de torque e coleta de amostra</i>	67
3.8 Ensaio de Termociclagem	68
3.9 Avaliação da contaminação microbiológica pelo método da hibridização <i>Checkerboard</i> DNA-DNA Hybridization.....	68
3.9.1 <i>Micro-organismos avaliados no teste de contaminação</i>	69
3.10 Processamento das amostras de saliva inicial, final e conteúdo coletado no interior dos implantes pela técnica de hibridização <i>Checkerboard</i> DNA-DNA hybridization	70
3.10.1 <i>Confeção das sondas genômicas de DNA</i>	70
3.10.2 <i>Verificação da sensibilidade das sondas genômicas</i>	70
3.10.3 <i>Aplicação das amostras de saliva inicial, final e conteúdo do interior dos implantes para reação de hibridização</i>	70
3.10.4 <i>Pré-hibridização das amostras</i>	73
3.10.5 <i>Aplicação das sondas de DNA genômico marcadas e reação de hibridização</i>	75
3.10.6 <i>Lavagem para remoção de sondas não hibridizadas</i>	77
3.10.7 <i>Detecção dos sinais de hibridização</i>	77
3.11 Exposição da membrana e revelação	78
3.12 Interpretação dos sinais de hibridização	79
3.13 Análises dos dados	80
4. RESULTADOS	81
4.1 Afrouxamentos dos parafusos dos pilares protéticos	83

4.2 Avaliação da microinfiltração na interface implante/pilar	84
5. DISCUSSÃO	94
5.1 Afrouxamento do parafuso do pilar protético.....	98
5.2 Micro-infiltração na interface implante/pilar protético	99
6. CONCLUSÃO	105
ANEXOS	125
ANEXO 1 - CONTAGEM MICROBIOLÓGICA DA SALIVA	127
ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	129
APÊNDICE.....	131

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A perda dos elementos dentários é um processo que envolve fatores biológicos, sociais, econômicos e até mesmo fatores culturais, o que resulta na necessidade de substituição do elemento perdido para restabelecimento da estética, função mastigatória, fonação, retenção e estabilidade oclusal (Júnior et al., 2014; Silva et al., 2015; Cardoso et al., 2016; Srinivasan et al., 2017; Mark, 2020; Carvalho et al., 2021).

Para solucionar esse problema, os implantes dentários mostram elevadas taxas de sobrevivência em pacientes que apresentam ausências dentárias unitárias, parciais ou totais (Vetromilla et al., 2019; Pardal et al., 2017; Comuzzi et al., 2020). Conceituada por (Brånemark et al., 1969) como a conexão direta entre osso e implante sob função, a osseointegração atingiu altos níveis de previsibilidade que permitiram a ampla utilização dos implantes dentários como base para construção de elementos protéticos (Brånemark et al., 1969; Douglas et al., 2002; Wittneben et al., 2014; Missika et al., 2018).

Apesar das altas taxas de sobrevivência, os implantes dentários estão sujeitos a complicações primárias, que acontecem logo após a sua instalação, e tardias, após algum tempo em função (Karoussis et al., 2004, Mendonça et al., 2009; Rani et al., 2016; Norton et al., 2020).

A estabilidade primária do implante é alterada por vários fatores: Densidade óssea, macro e micro geometria do implante e técnica cirúrgica (Javed et al., 2011; Oue et al., 2015; Comuzzi et al., 2020). Em relação à macro-geometria, a forma cilíndrica pode levar a um maior contato osso/implante, se comparado com uma geometria cônica (Degidi et al., 2007; Möhlhenrich et al., 2016; Comuzzi et al., 2020). Todavia, o uso de implantes cônicos pode representar uma vantagem em casos de rebordos alveolares de diâmetro reduzido e ossos de menor densidade (Malchiodi et al., 2006; Gehrke et al., 2016; Tumedei et al., 2019; Carvalho et al., 2020).

As falhas tardias acontecem quando a osseointegração é prejudicada devido à sobrecarga e/ou infecção ocasionada pela infiltração de micro-organismos através da conexão implante-pilar protética que penetram na superfície interna do implante (Karoussis et al., 2004; Lopes et al., 2010; Norton et al., 2020).

A peri-implantite pode ser caracterizada como uma reação inflamatória no tecido conjuntivo peri-implantar seguida pela perda progressiva de osso em torno dos implantes dentários, ocasionando na micro-infiltração de fluidos e micro-organismos pela interface implante-pilar (Buser et al., 1990; O'Mahony, 2000; Oliveira et al., 2015; Lee et al., 2017; Yu

et al., 2020). A micro-infiltração permite que os micro-organismos patogênicos invadam os tecidos ao redor do implante, gerando a resposta imune do hospedeiro, pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da remodelação óssea, como o *RANKL* e enzimas proteolíticas. (Larrucea et al., 2018; Yu et al., 2020; Kensara et al., 2020).

Existem semelhanças entre doença periodontal e peri-implantar (Schwarz et al., 2018), sendo ambas doenças inflamatórias causadas por bactérias e com características clínicas, progressão da doença e tratamento semelhante (Cho et al., 2020). Contudo, de acordo com a literatura, diferenças estruturais nas interfaces osso/ligamento periodontal/dente e osso/implante representam uma distinção relevante na progressão das doenças (Cho et al., 2020; Hussain et al., 2021). Lafaure et al., (2017), afirmaram que periodontite e peri-implantite apresentavam diferenças em suas composições microbianas, sendo a peri-implantite uma infecção mais heterogênea e complexa, quando comparada com a periodontite, mais homogênea e simples.

A peri-mucosite precede a peri-implantite e, desta forma, é essencial que haja terapia preventiva para a preservação e manutenção da saúde mucosa ao redor do implante, uma vez que o processo de peri-mucosite é muito semelhante ao da gengivite (Meyer et al., 2019; Al-Sabbaghe et al., 2019). Há evidências científicas demonstrando que, assim como a gengivite, a peri-mucosite é reversível quando adequadamente tratada (Pontoriero et al., 1994; Heitz & Salvi, 2018; Hussain et al., 2021).

Clinicamente, a peri-implantite se manifesta através de sangramento e/ou supuração após sondagem do tecido peri-implantar, aumento da profundidade de sondagem em relação à exames prévios e hiperplasia gengival (Alani et al., 2014; Berglundh et al., 2017). Além disso, perda óssea ao redor do implante, lesão em forma de cratera ou taça e exposição das roscas do implante podem ser encontrados radiograficamente (Heitz et al., 2008; Klinge et al., 2018). Quando não tratada, pode levar à extensa destruição do tecido ósseo de suporte e perda do implante dentário (Oliveira et al., 2015; Steffens et al., 2018; Berglundh et al., 2019).

Embora o biofilme bacteriano seja reconhecido como um elemento essencial no desenvolvimento da peri-implantite, sua etiologia é sugerida como multifatorial. A resposta imunológica do hospedeiro e o fator de virulência dos patógenos influenciam de forma relevante a colonização e multiplicação dos micro-organismos, sendo considerados fatores críticos para o estabelecimento da doença (Lee et al., 2017; Fu & Wang, 2020, Kim et al., 2022).

A interface da conexão implante-pilar é considerada um dos principais fatores que modulam as alterações do nível ósseo peri-implantar (Lemos et al., 2021; Camps et al.,

2021). Com o objetivo de diminuir as limitações das próteses sobre implantes, os tipos de conexões e pilares protéticos foram se desenvolvendo para serem mais eficientes e hoje o mercado disponibiliza diversas opções (Shibata et al., 2015; Varice et al., 2015). Nas reabilitações implanto-suportadas, um ponto importante a ser considerado é a conexão do implante ao pilar protético, pois independentemente da geométrica do implante, o pilar protético é fixado ao implante por meio de uma interface implante-pilar Quek et al. (2006), Vélez et al. (2020) e, dependendo do nível de infiltração de fluídos e micro-organismos, pode ter como resultado indesejado o acúmulo de biofilme em seu interior (Tsurata et al., 2018; Carinci et al., 2019).

A junção implante-pilar é classificada como interna ou externa. A externa mais utilizada é a hexagonal. As internas incluem o cone morse, o hexágono interno e octógono interno, funcionado por encaixes ou ajustadas com atrito (Oliveira & Ladeia, 2011; Lemos et al., 2021).

Ainda que alguns estudos demonstrem comportamento similar relacionados ao estresse sofrido nas conexões internas e externas, grande parte dos estudos demonstra que as conexões internas apresentam melhor desempenho biomecânico quando comparado com as conexões externas (Khraisat et al., 2002; Drago et al., 2006; Gehrke et al., 2017; Ellakany et al., 2021).

Foi demonstrado em uma revisão da literatura (Alsubaiy, 2020) que até 45% dos parafusos dos pilares afrouxam no primeiro ano de instalação da prótese e que uma das causas seria o design incorreto da conexão implante/pilar, comprimento do parafuso, angulações do pilar, diâmetro do implante, processo de tratamento do implante e reaperto do parafuso do pilar (Binon et al., 2000; Londhe et al., 2020). Além disso, se o processo de afrouxamento continuar por um longo período de tempo, pode levar à fratura do parafuso (Assunção et al., 2012; Fetosa et al., 2013, Pardal et al., 2017). A estabilidade do parafuso do pilar protético pode ser afetada pela pré-carga (torque aplicado ao parafuso para fixação do pilar ao implante dentário). Esse torque é fundamental no sucesso da reabilitação protética, porque muitos problemas mecânicos de fratura ou afrouxamento de componentes estão correlacionados com uma pré-carga insuficiente (Burguete et al., 1994; Siamos et al., 2002; Park et al. 2010; Rocha et al., 2014). A pré-carga mantém as roscas do parafuso firmemente presas à contraparte do implante e mantém as peças juntas produzindo uma força de fixação (Mc Glumphy et al., 1998; Park et al. 2010, JORN et al., 2014). Portanto, parafusos com a pré-carga ideal, resultam em menor micro movimentações na interface implante-pilar protético (Lang et al., 2004; Lee et al. 2002). Além disso, outros fatores como o efeito do assentamento, geometria

do parafuso, material dos componentes, fadiga do metal, coeficiente de fricção entre componentes, micro movimentos durante a função mastigatória, cargas funcionais fora do eixo axial do implante, torque aplicado insuficiente, elasticidade óssea e velocidade de fixação dos parafusos estão envolvidos com o afrouxamento do parafuso (Siamos et al., 2002; Park et al. 2010; Rocha et al., 2014; Vinhas et al., 2020).

A conexão cônica interna, geralmente orientada por um parafuso de fixação no pilar protético, apresenta excelente retenção friccional entre o pilar e o interior do implante, o que lhe permite adequado efeito antirrotacional e, conseqüentemente, limitação dos movimentos e formação de *microgaps* (Oliveira & Ladeia, 2011; Mishra et al., 2017; Liu et al, 2017). Como resultado destas vantagens mecânicas, esse tipo de conexão tem por objetivo limitar a infiltração de fluidos e micro-organismos (Do Nascimento et al., 2012; Tsuruta et al., 2018). Em implantes com conexão tipo cone morse a formação de espaços na interface implante-pilar protético é reduzida quando comparada as demais conexões, sendo potencialmente mais eficaz na redução da infiltração de fluidos e micro-organismos para o interior dos implantes (Do Nascimento et al., 2012; Da Silva-Neto et al., 2017). Assim, sugere-se que os implantes com conexão cônica apresentam melhor desempenho clínico e menor prevalência de doenças peri-implantares e outras complicações tardias (Macedo et al, 2016; Mello et al., 2017; Lauritano et al., 2020).

Ainda não exista um consenso na literatura com relação ao ao espaço aceitável na interface implante-pilar protético, os estudos encontrados revelam que o tamanho do *microgap* pode variar de 0,1 a 10 μm , podendo aumentar significativamente com o implante em função (Do Nascimento et al., 2015, Do Nascimento et al., 2016; De Sousa et al., 2020).

Desta forma, os espaços resultantes da adaptação implante-pilar, mesmo que reduzidos, seriam suficientes para permitir a infiltração de fluidos e micro-organismos, uma vez que a maiorias das bactérias orais apresentam dimensões que variam de 0,2 a 1,5 μm de largura e 2 a 10 μm de comprimento (Cosyn et al., 2011; Passos et al., 2013; Schimitt et al., 2014; Do Nascimento et al., 2015).

Nesse contexto, a literatura mostra que diferentes tipos de pilares em um mesmo sistema de implante têm *microgaps* diferentes (Bulaqi et al., 2015; Karl et al., 2016). O pilar tipo UCLA, é caracterizado pelo seu encaixe direto na plataforma protética do implante. Seu processo de fundição requer várias etapas de laboratório que podem resultar em distorções e a maior tendência de afrouxamento do parafuso (Almodalal et al., 2022).

Os pilares pré-fabricados de titânio *TiBase* podem ser utilizados no fluxo convencional ou serem associados ao sistemas CAD-CAM que permite a produção de

restaurações implanto-suportadas totalmente no fluxo digital quase 3 vezes mais eficiente do que fluxos convencionais de trabalho (Vall et al., 2021; Al-Thobityet al., 2022). Cada base de *TiBase* é projetada por um sistema específico, que resulta em uma conexão implante/pilar com menos chances de formação de *microgaps* e infiltração bacteriana (Moreno et al., 2022)

Ramalho e colaboradores (2020), avaliaram o efeito de diferentes fluxos de trabalho para a fabricação de pilar no ajuste interno da interface implante/pilar e os resultados revelaram que o método de fabricação do pilar influenciou no encaixe interno da interface implante/pilar e o fluxo de trabalho totalmente digital resultou em um encaixe interno menos favorável em comparação com o método de fundição do tipo UCLA e *TiBase*. Pilares pré-fabricados *Ti-base* e UCLA apresentaram melhor ajuste interno no implante/conexão de pilar em comparação aos pilares CAD/CAM personalizados (Ramalho et al., 2020).

Um estudo que investigou o selamento microbiológico em conexão cônica utilizando pilares do tipo Pilar Universal não indexado e Pilar UCLA indexado encontrou falha de vedação da interface pilar/implante em 4/11 (36,4%) dos componentes indexados (UCLA), enquanto 10/11 (90,9%) dos componentes não indexados (Pilar Universal) estavam contaminados, revelando diferença significativa entre os grupos no mesmo tipo de conexão ($p=0,0237$) (Peruzetto et al., 2016).

Apesar de todos os esforços científicos objetivando a redução dos espaços entre os componentes dos implantes, ainda não existe uma conexão que seja totalmente hermética e previna a passagem de fluidos orais e micro-organismos (Schmitt et al., 2014; Caricasulo et al., 2018; Vetromilla et al., 2019 e Lauritano et al., 2020). Mesmo que as pesquisas revelem, de uma forma geral, que conexões internas cônicas apresentam um menor índice de infiltração e contaminação bacteriana, sabe-se que ainda assim, muitos micro-organismos passam por sua interface implante-pilar protético. A identificação das diferentes espécies de micro-organismos que habitualmente colonizam a cavidade bucal se faz necessária se entender o processo de micro-infiltração de fluidos por meio da interface implante/pilar protético e seu potencial impacto no desenvolvimento de doenças dos tecidos de suporte (Do Nascimento et al., 2012, Do Nascimento et al., 2016). Vários métodos de diagnóstico molecular foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas com objetivo de detecção e quantificação dos micro-organismos que podem estar envolvidos em processos infecciosos e inflamatório da cavidade oral (Sakamoto et al., 2005). Descrita por Sockansky et al. (1994 e 2004), a técnica de hibridização *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* possibilita a identificação, simultânea, de até 45 espécies microbianas em um total de 28 amostras clínicas de biofilme. A técnica apresenta como uma das principais vantagens, a superação de limitações de detecção

das técnicas tradicionais de cultura microbiológica, uma vez que não depende da viabilidade celular, representando uma grande vantagem quando existe o interesse de se investigar micro-organismos fastidiosos e/ou anaeróbios estritos (Sokansky et al., 2004; Do Nascimento et al., 2009).

A justificativa para a realização deste estudo fundamenta-se nos relatos da literatura descritos acima, e procura trazer novos registros e informações relacionadas ao comportamento biomecânico de diferentes conexões de implantes, sendo necessário entender melhor o comportamento desses componentes em relação ao afrouxamento do parafuso do pilar protético e seu impacto sobre a microinfiltração de micro-organismos por meio da interface implante-pilar em condições semelhantes à da cavidade bucal, sob variações de temperatura e carregamento mecânico cíclico similar ao da mastigação.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos e a passagem de bactérias presentes na saliva humana por meio da interface implante-pilar protético após aplicação de carga cíclica controlada.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar o afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos após aplicação de carga cíclica controlada nos diferentes implantes e componentes protéticos.
- Identificar e quantificar, por meio da técnica de hibridização Checkerboard DNA-DNA hybridization, os micro-organismos presentes no interior dos nos diferentes implantes e componentes protéticos após aplicação de carga cíclica controlada.

2.3 Hipótese

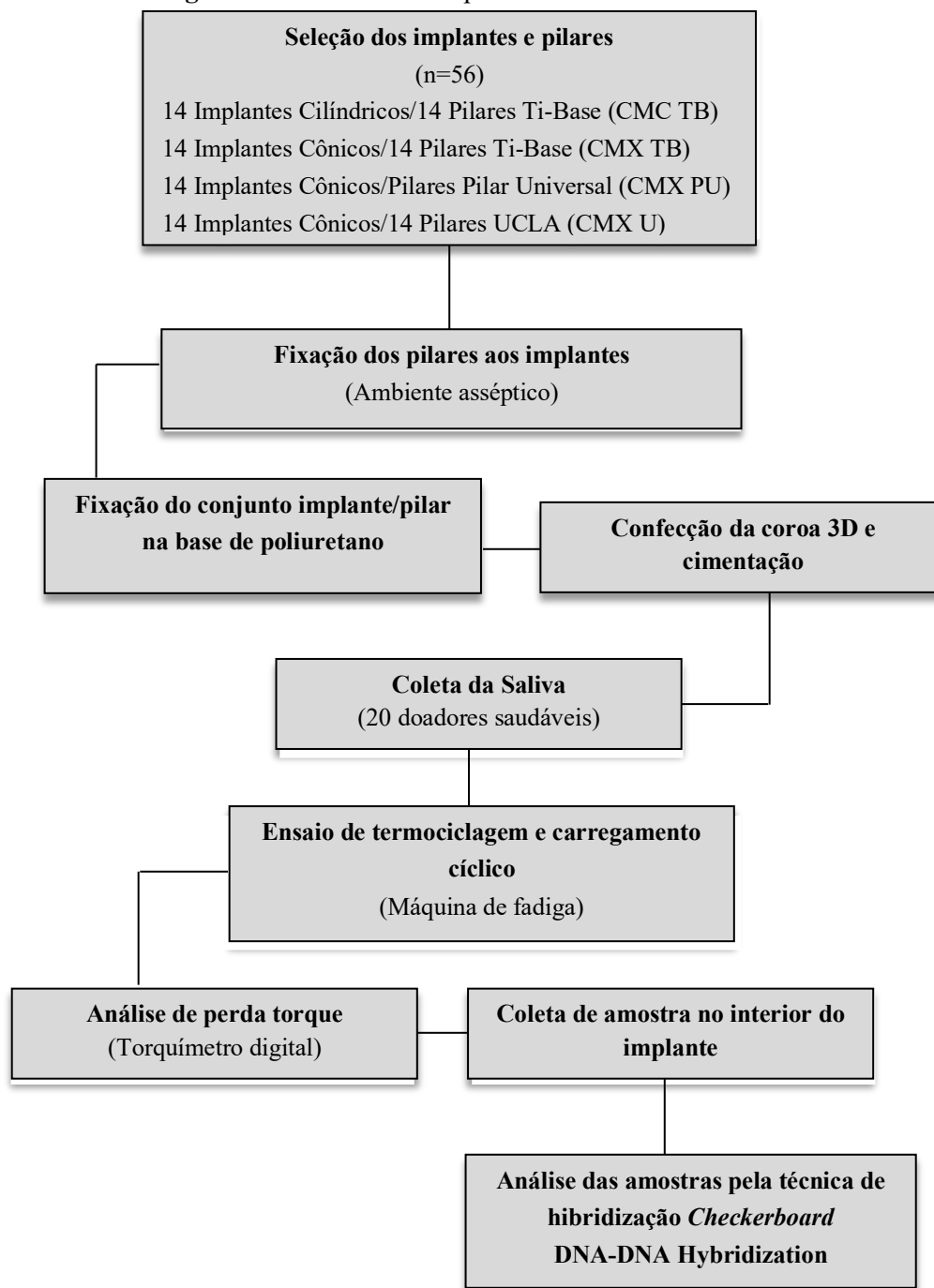
- Existem diferenças significantes nos valores de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos e, conseqüentemente, no perfil microbiano presente em cada um dos diferentes conjuntos de implantes e componentes protéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Trata-se de um modelo experimental randomizado *in vitro*, de grupos paralelos, para investigação do afrouxamento do parafuso do pilar protético e seu potencial impacto na infiltração de micro-organismos por meio da interface implante/pilar protético de um sistema com implantes cilíndricos e cônicos, com conexão do tipo cone morse e diferentes pilares protéticos. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A saliva humana foi utilizada como meio contaminante e o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local sob o parecer 4.968.932 (Anexo 2) e todos os experimentos foram realizados com o consentimento por escrito dos participantes (Apêndice 1).

Figura 1- Delineamento experimental do estudo.

Fonte: Mata (2022)

3.2 Seleções dos implantes e pilares e constituição dos grupos de estudo

Esta pesquisa contou com a utilização de implantes odontológicos de titânio grau 4 (n=56) com conexão do tipo cone morse (Singular Implants, Rio Grande do Norte, Brasil), dos quais 42 apresentam formato cônico (CMX; 4.0 x 13 - Ref: 100. 194) e 14 cilíndrico (CMC; 4.0 x 13 - Ref: 100.124).

Três tipos de pilares foram utilizados:

- Pilar Base Tibase4 CAD N 1.5 mm (TB; Ref: 126.125) = 28
- Pilar Universal CM 3.3 x 4 1.5 mm (PU; Ref: 119.014) = 14
- Pilar UCLA em CO-CR CM 1.5 mm (U; Ref: 103.120) = 14

Os grupos de estudo ficaram assim definidos:

- Implante cilíndrico e Pilar Base Tibase4 (CMC TB)
- Implante cônico e Pilar Base Tibase4 (CMX TB)
- Implantes cônico e Pilar Universal (CMX PU)
- Implantes cônico e Pilar UCLA (CMX U)

3.3 Coleta de controle negativo e fixação dos pilares aos implantes

Previamente à união dos pilares protéticos aos implantes, amostras da parte interna dos implantes e das superfícies dos parafusos dos 4 grupos (CMC TB, CMX TB, CMX PU e CMX U) foram coletados com auxílio de escovas do tipo *microbrush* esterilizadas, para servirem de controle negativo à contaminação, com um total de 56 amostras obtidas. As amostras foram armazenadas de forma individual em microtubos com 80 µL de solução tampão TE (10 Mm Tris-HCl, 1 Mm EDTA pH 7,6).

O conjunto implante/pilar foi conectado por meio um torquímetro digital (*Torque Meter TQ 8800*, Instrutherm, São Paulo, Brasil) que foi encaixado a um delineador criado no Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, a fim de manter padronizado o posicionamento da chave protética para aplicação da força (torque). Os pilares foram conectados aos implantes aplicando a carga de torque Ncm recomendado pelo fabricante Singular Implants, Brasil:

- 32 Ncm no pilar Base Tibase 4 CAD sobre o implante cilíndrico (CMC TB)
- 32 Ncm no pilar Base Tibase 4 CAD sobre o implante cônico (CMX TB)
- 32 Ncm no pilar Universal Reto (n=14) sobre implante cônico (CMX PU)
- 20 Ncm no pilar UCLA Co-Cr sobre implante cônico (CMX U)

Como recomendado pela literatura, após 10 minutos de aplicação da carga recomendada pelo fabricante, foi realizado o retorque do parafuso de retenção aplicando a mesma carga, objetivando evitar a perda de torque resultante da deformação e escoamento dos componentes (Jörn'eus et al., 1992; Bello et al., 2021)

Todas as etapas de adaptação dos componentes aconteceram utilizando um fluxo laminar, com a superfície de trabalho desinfetada com álcool 70% e previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. A vidraçaria, pinças e chaves para aplicação de força foram previamente esterilizadas em autoclave e os pesquisadores paramentados com equipamento de proteção individual.

Figura 2- Pilar Base Tibase 4 CAD conectado ao implante Cone Morse.



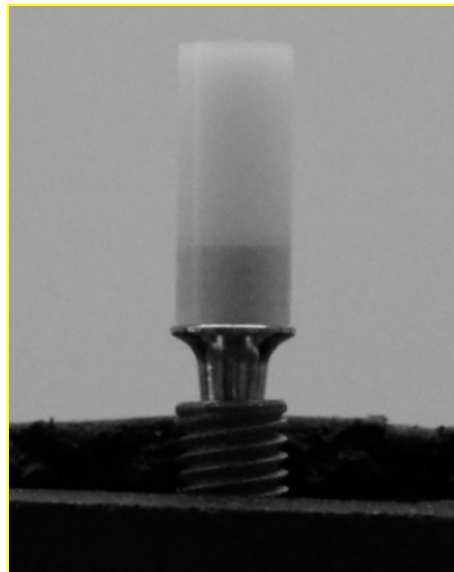
Fonte: MATA (2022)

Figura 3- Pilar Universal conectado ao implante Cone Morse.



Fonte: MATA (2022)

Figura 4- Pilar UCLA conectado ao implante Cone Morse.



Fonte: MATA (2022)

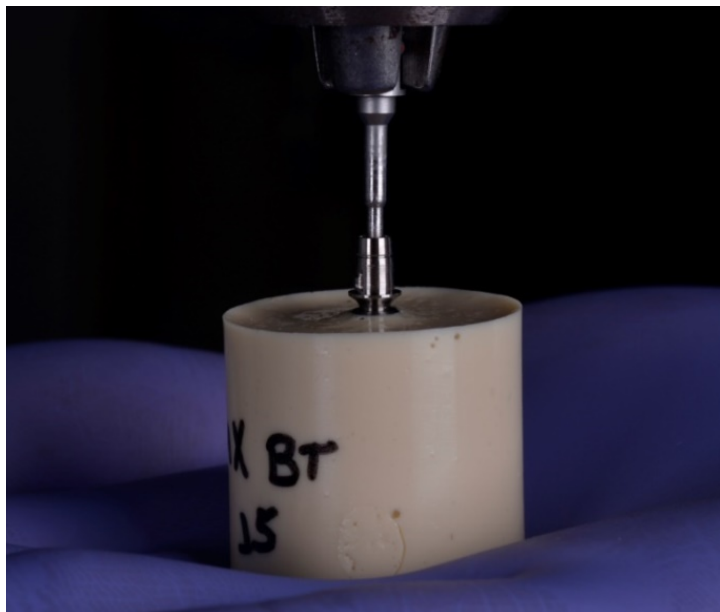
3.3.1 Obtenção das bases de poliuretano e posicionamento dos implantes e pilares protéticos

Os 56 conjuntos implante-pilar foram embutidos em poliuretano para serem submetidos a termo ciclagem e carga cíclica previamente ao teste de contaminação microbiana. Uma base de silicone foi usada como molde para construção dos corpos de prova. Em uma balança de precisão foram pesados 7,5g de Polioli + 7,5g de Isocianato (*Isocyanate F 160*, Sika Axson, Michigan, EUA), manipulados por 30 segundos, vertidos na base de silicone e aguardados o processo de polimerização, conforme recomendações da bula do produto.

Para a padronização no posicionamento dos implantes na base de poliuretano, foi utilizado um paralelômetro de base ajustável. A base de silicone foi posicionada sobre a base do paralelômetro e o conjunto implante/pilar protético conectado à haste móvel, assegurando a mesma posição em todos os conjuntos.

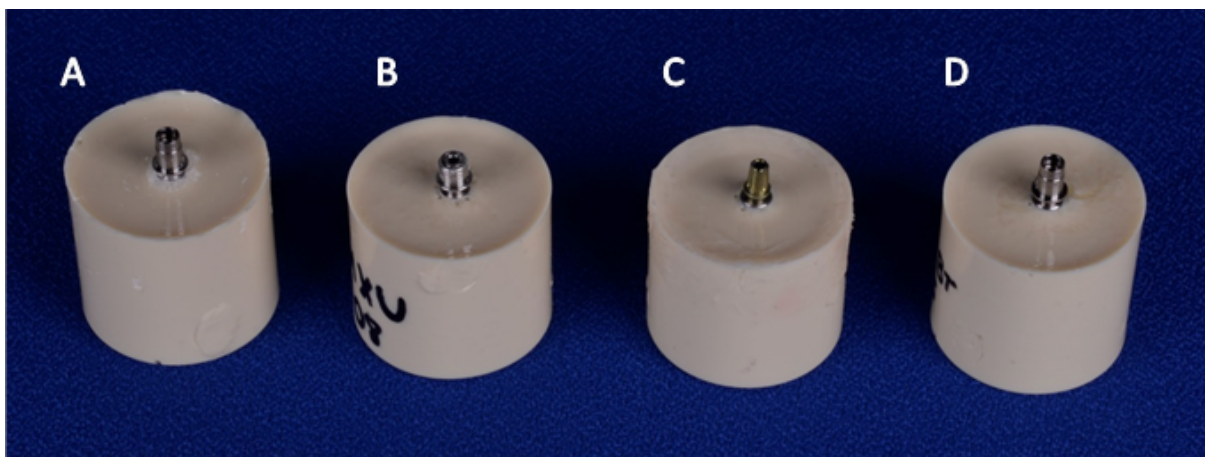
O posicionamento dos implantes foi realizado de forma que a plataforma a protética ficasse ao nível da superfície do poliuretano, simulando um implante ao nível ósseo.

Figura 5- Pilar protético sendo submetido à aplicação de força (torque) com auxílio do torquímetro digital.



Fonte: MATA (2022)

Figura 6- Conjuntos implante/pilar protético embutidos no poliuretano. **A)** Pilar Base Tibase 4 CAD conectado ao implante cone morse cilíndrico. **B)** Pilar UCLA conectado ao implante cone morse cônico. **C)** Pilar Universal conectado ao implante cone morse cônico. **D)** Pilar Base Tibase 4 CAD conectado ao implante cone morse cônico.



Fonte: Mata (2022)

3.4 Confeção das coroas 3D

Sobre os pilares protéticos foram adaptadas coroas no formato de canino superior, confeccionadas em resina pela técnica de impressão 3D, com o auxílio do *software* MashMixer, para a aplicação da carga cíclica sobre o conjunto (Figura -8). Para definir as dimensões das coroas para os diferentes pilares foi realizada a projeção e medição de cada pilar em um projetor de perfil (Profile Projector Model 6C, Nikon, Tóquio, Japão).

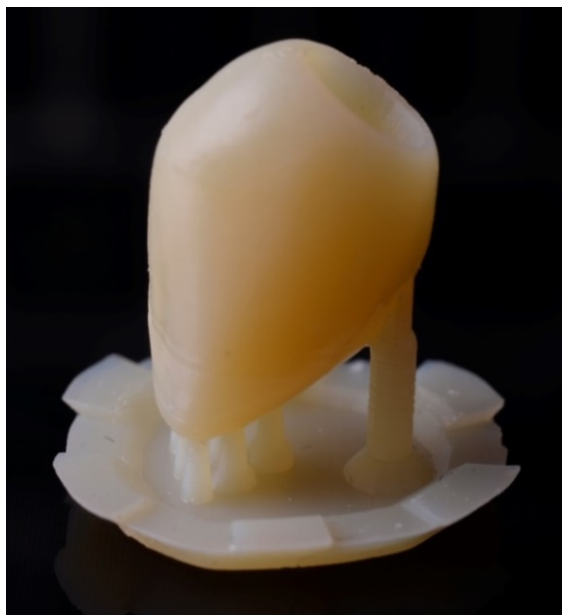
As coroas foram impressas na impressora 3D Phrozen Sonic4^a (Printax Odontomega, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) com resina 3D de para provisório (Printax, Odontomega, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os aplicadores de força com 15mm de diâmetro x 15 mm de largura e angulação na região interna de 10° que foram acoplados a máquina de fadiga também foram confeccionados seguindo o mesmo protocolo das coroas.

Figura 7- (A) Projetor de perfil e (B) Impressora 3D Phrozen.



Fonte: Mata (2022)

Figura 8- Coroa no formato de canino superior em resina pela técnica de impressão 3D.



Fonte: Mata (2022)

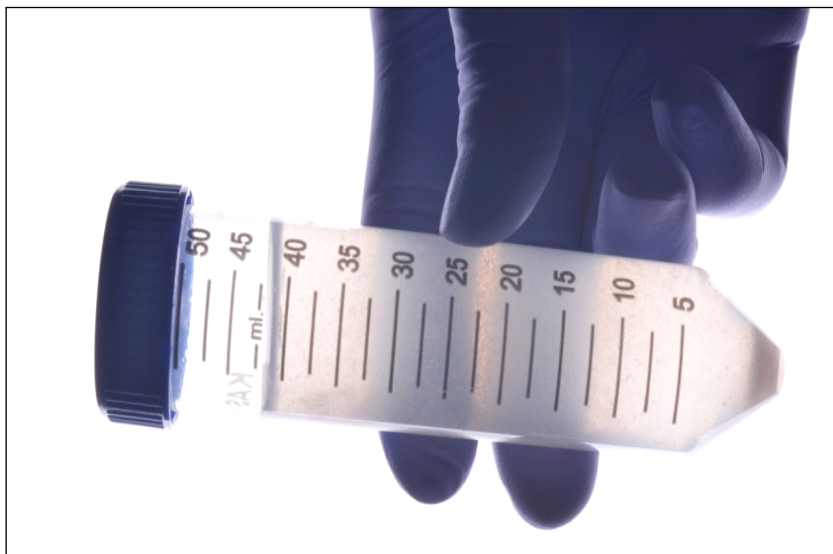
3.5 Coleta da saliva

Para a coleta da saliva humana, utilizada como meio contaminante para os implantes, 20 adultos saudáveis foram selecionados entre alunos e funcionários da própria universidade. Durante todo o estudo foi livre a participação dos colaboradores na pesquisa.

Foram incluídas pessoas de ambos os sexos com ausências de sinais e sintomas de doenças sistêmicas ou infecções na cavidade bucal. Além disso, buscou-se um grupo de pessoas com idades e condições ambientais parecidas, objetivando amostras de saliva uniformes. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário e local.

Cada participante colaborou com 6 mL de saliva, que foram individualmente acondicionados. As amostras de saliva dos 20 participantes foram homogeneizadas durante 3 minutos e transferidas para um tubo único, armazenado em estufa bacteriológica a 37°C durante todo o ensaio de carga cíclica e termociclagem.

Figura 9- Saliva coletada e homogeneizada dos 20 participantes.



Fonte: Mata (2022)

3.6 Preparo final dos copos de prova e Teste de Contaminação

Após o re-torque, o canal de acesso ao parafuso foi vedado com fita teflon e resina composta microhíbrida fotopolimerizável (Applic Flow- Maquira), em seguida a coroa foi cimentada sobre os componentes com Poliéter (Impregum soft – 3M).

Tubos de P.V.C. foram fixados ao poliuretano com silicone à base d'água e, dessa forma, o conjunto implante/pilar ficaram isolados do meio externo em um reservatório para colocação de saliva durante o ensaio de aplicação de carga cíclica. Foram inseridos no interior de cada um dos reservatórios 3 mL de saliva (Figura 11). O volume de saliva adicionado foi suficiente para cobrir a interface de conexão implante-pilar protético, sem atingir o orifício de acesso do parafuso de fixação do pilar, de modo a minimizar a passagem de microorganismos da saliva por qualquer outra via além da interface implante-pilar protético. Ao final do ensaio de carga cíclica, foram coletadas amostras da saliva (n=10) utilizadas como meio contaminante para cada um dos grupos investigados, para servirem como controle de verificação do perfil microbiano da saliva antes e após o período de ensaio de carga.

3.7 Ensaio de termociclagem e carregamento cíclico

Dez conjuntos implante-pilar protético, de cada grupo, foram submetidos ao ensaio de carga cíclica. Foi utilizada a máquina de fadiga mecânica por mastigação (BIOPDI – Equipamentos para pesquisa de materiais médicos e odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) para simular a mastigação humana, que se encontra no Laboratório de Biomecânica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. Esta máquina possibilitou a condução de ensaios dinâmicos sobre 10 corpos de prova simultaneamente. Sobre os 10 pistões foram confeccionados aplicadores de força através da impressora 3D em resina. Os 10 pistões usados para a aplicação de carga atuavam de forma independente sobre cada corpo de prova.

A aplicação de força sobre cada corpo de prova durante a simulação dos ciclos mastigatórios ocorreu por meio de um sistema de molas. Além disso, um sistema de termociclagem permitiu a manutenção da temperatura de 37°C, semelhante ao encontrado na cavidade bucal, variando (+ ou - 1 °C). Esse processo de aplicação de força foi realizado de maneira automática.

Os corpos de prova contendo os conjuntos implantes-pilares protéticos imersos em saliva foram fixados à base da máquina de ensaios ficando justapostos, uma vez que suas bases em poliuretano foram construídas com a mesma dimensão dos nichos de fixação da máquina. Os espécimes foram posicionados e a carga foi aplicada na incisal da coroa protética ao longo eixo do implante. Todo o sistema foi selado com película flexível de ação aderente (Parafilm, Neehan, Wisconsin, EUA), o que permitiu o seu isolamento do meio externo (Figura - 12).

A máquina foi programada para a aplicação controlada de uma carga de 120 N através dos aplicadores de força na região incisal de cada coroa (Figura 13). Foram realizados

2×10^6 de ciclos, com frequência de 5 Hz. Simultaneamente, a base onde estavam fixados cada corpo de prova realizavam movimentos horizontais de 1 mm para o lado direito e 1 mm para o lado esquerdo, replicando os movimentos excursivos da mandíbula.

Figura 10- Aplicação de saliva no interior do corpo de prova com o auxílio de uma pipeta. Os corpos de prova fixados à base da máquina de carga cíclica com o aplicador de força posicionado sobre a coroa.



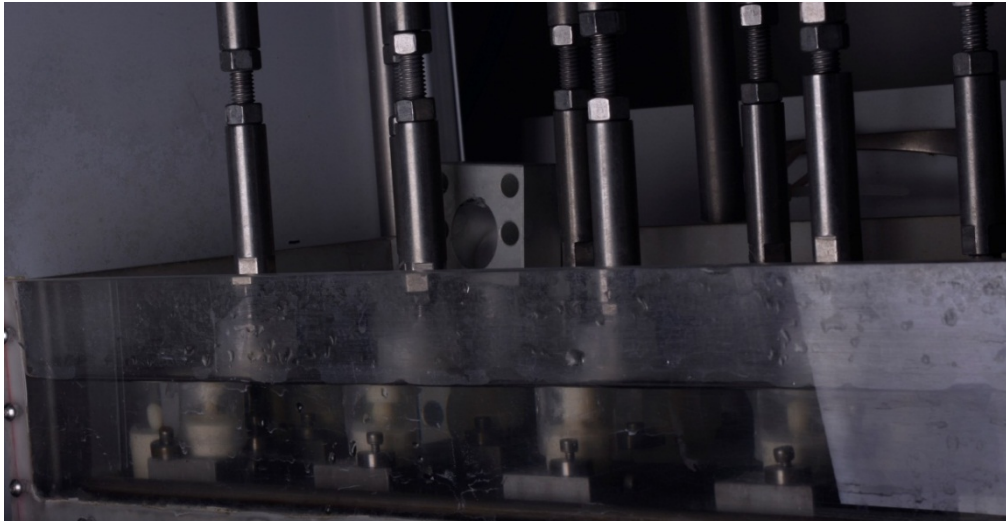
Fonte: Mata (2022)

Figura 11- Corpos de prova devidamente posicionados na máquina de ensaios com saliva e isolados do meio externo com *Parafilm*.



Fonte: Mata (2022)

Figura 12- Pistões da máquina de fadiga mecânica com os aplicadores de força posicionados ao longo eixo das coroas.



Fonte: Mata (2022)

3.7.1 Obtenção de dados da perda de torque e coleta de amostra

Concluída a aplicação de carga cíclica, os conjuntos foram removidos da máquina e os tubos de borracha foram retirados da base de poliuretano. Todas as superfícies externas dos conjuntos experimental e controle foram lavados cuidadosamente com álcool 70% e secados com compressas de gaze esterilizada. As coroas foram então removidas do pilar protético com o auxílio de pinça do tipo hemostática.

O registro da perda de torque foi realizado por meio do torquímetro digital através do destorque do parafuso ao final do ensaio. Para calcular a perda de torque foi utilizada a seguinte fórmula (Park et al., 2010):

$$\text{Perda de torque final (\%)} = \frac{(\text{Torque de confirmação} - \text{Destorque final}) \times 100}{\text{Torque de confirmação}}$$

Posteriormente ao registro do afrouxamento, foi realizada a reabertura dos conjuntos para coleta de conteúdo do interior dos implantes e roscas dos parafusos de fixação através de pincel do tipo *microbrush* (Figura - 14). As amostras foram armazenadas de forma individual em microtubos contendo 150 μL de solução tampão TE e foram armazenados em 4°C até o processamento laboratorial.

Figura 13- Coleta de amostras do interior do implante após termociclagem e carga cíclica.



Fonte: MATA (2022)

3.8 Ensaio de Termociclagem

Os espécimes também foram testados quanto à passagem de micro-organismos quando submetidos apenas a ciclagem térmica, sem carga cíclica. Três conjuntos implante/pilar protético de cada um dos 4 grupos analisados foram fixados ao poliuretano e submersos em 3 mL da saliva humana e acoplados à base da máquina de fadiga, sendo submetidos apenas a termociclagem, sem aplicação de força.

3.9 Avaliação da contaminação microbiológica pelo método da hibridização *Checkerboard* DNA-DNA Hybridization

Amostras do interior dos conjuntos implante-pilares submetidos aos ensaios de termociclagem com carga cíclica e somente termociclagem foram coletadas para serem identificados os micro-organismo que penetram em seu interior. Para isso, foi utilizada a técnica de hibridização de sondas de DNA genômico *Checkerboard* DNA-DNA Hybridization, em conformidade com (Socransky et al., 1994) e modificada por (Do Nascimento et al., 2010).

Figura 14- Amostra coletada e armazenada para análise microbiológica.



Fonte: Mata (2022)

3.9.1 *Micro-organismos avaliados no teste de contaminação*

Para este estudo foram selecionadas 40 espécies microbianas, contendo desde os colonizadores iniciais do biofilme microbiano até espécies consideradas patogênicas para o desenvolvimento das doenças periodontais e peri-implantares. Também, quatro espécies de *Cândida*, comumente detectadas na cavidade bucal, sendo eles: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida albicans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus gallolyticus*, *Veillonella parvula*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus pasteurii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Solobacterium moorei*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus constellatus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas putida*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma salivarium*, *Lactobacillus casei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Eikenella corrodens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Bacteroides fragilis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

A obtenção do DNA genômico das espécies selecionadas para o estudo foi previamente realizada pela equipe do Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular do departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, que segue o protocolo de extração de DNA usado CTAB (Doyle, 1990, modificado).

3.10 Processamento das amostras de saliva inicial, final e conteúdo coletado no interior dos implantes pela técnica de hibridização *Checkerboard* DNA-DNA hybridization

3.10.1 Confeção das sondas genômicas de DNA

A confecção das sondas genômicas das espécies selecionadas para esse estudo seguiu o protocolo estabelecido pela empresa fabricante do marcador genômico (*Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA do microrganismo a ser investigado, atingindo uma concentração final de 1 ng/ μ L de sonda na solução hibridizada. Após diluição, os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos. Imediatamente, foram resfriados com gelo por mais 5 minutos a fim de manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os tubos mantidos no gelo, foram adicionados os componentes do kit de marcação, primeiro 10 μ L de *Reaction Buffer*, 2 μ L de *Labelling* reagente e 10 μ L de *cross-link solution* (1:4) [GE Healthcare]. Os tubos foram levemente agitados e incubados a 37°C por 30 minutos.

3.10.2 Verificação da sensibilidade das sondas genômicas

A sensibilidade da técnica de hibridização DNA-DNA *Checkerboard* foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridização positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células microbianas, e foram hibridizadas contra as sondas marcadas. Estas diluições são utilizadas como padrões de referência para a quantificação de microrganismos após a reação de hibridização.

3.10.3 Aplicação das amostras de saliva inicial, final e conteúdo do interior dos implantes para reação de hibridização

Previamente ao processamento, as amostras de saliva inicial, final e conteúdo do interior dos implantes dos 4 grupos foram homogeneizadas por 4 minutos em um agitador de tubos (AP 56, Phoenix, Brasil) para a desagregação total do conteúdo coletado pela escova do tipo *microbrush*. Os microtubos foram então fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA, e imediatamente resfriados em gelo por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram neutralizadas com adição de 800 μ L de acetato de amônia 5M. Concomitantemente, dois microtubos contendo a quantidade de 10^5 e 10^6 células das 40 espécies-alvo do estudo foram processados seguindo o mesmo protocolo, para servirem como padrões de comparação para a quantificação dos sinais de hibridização.

As amostras de DNA foram aplicadas sobre uma membrana de nylon de 15 cm², carregadas positivamente (*Hybond N+*, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) posicionadas dentro de um aparelho metálico, denominado *Minislot 30* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA). Este aparelho metálico é constituído por canaletas dispostas paralelamente e individualizadas, possibilitando a deposição de até 28 amostras de DNA e 2 padrões contendo 10⁵ e 10⁶ células de cada espécie investigada.

Cada amostra e padrões de comparação foram depositados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão. Após 5 minutos, para a ligação do DNA na membrana de nylon, a solução remanescente foi removida com auxílio de bomba a vácuo conectada ao *Minislot 30*.

Figura 15- Micro tubos fervidos a 95°C por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA.



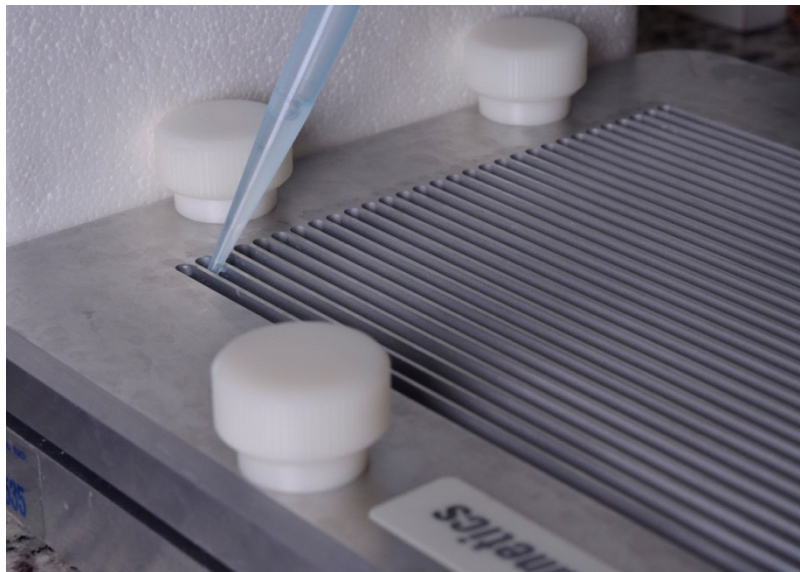
Fonte: Mata (2022)

Figura 16- Microtubos imediatamente resfriados em gelo por 5 minutos.



Fonte: Mata (2022)

Figura 17- Aplicação das amostras de DNA sobre a membrana de *nylon* posicionada no interior do *Minislot*.



Fonte: Mata (2022)

Figura 18- Após 5 minutos, para a ligação do DNA na membrana de nylon, a solução remanescente foi removida com auxílio de bomba a vácuo conectada ao *Minislot 30*.



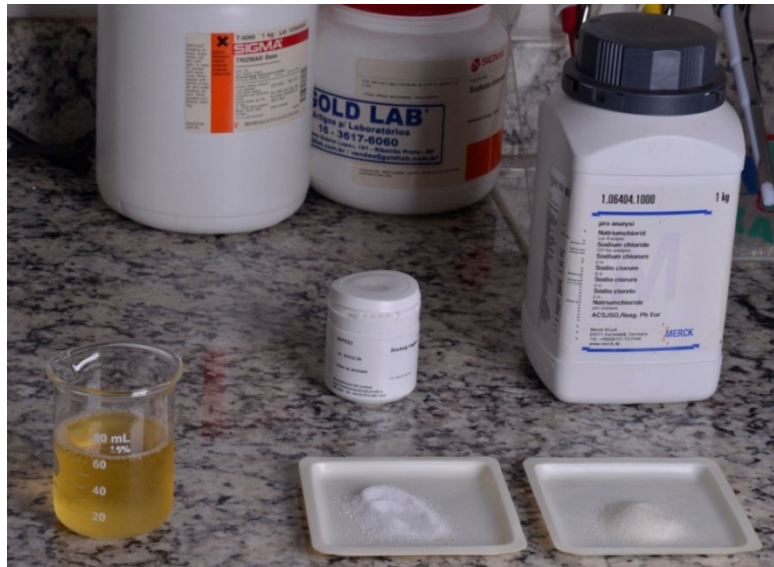
Fonte: Mata (2022)

A membrana foi removida do aparelho, transferida para um invólucro de papel kraft e mantida em estufa a 120°C (SX 1.2 DTME, *Sterilifer* Ind. e Com. Ltda., SP), por 20 minutos, para viabilizar a fixação do DNA à membrana.

3.10.4 Pré-hibridização das amostras

Após a fixação dos DNAs das amostras, uma solução contendo NaCl 1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* (Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer reagent* (Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) foi preparada e aplicada sobre a membrana. A membrana foi então embalada em um invólucro de plástico e pré-hibridizada no forno de hibridização em 63,5°C, por 6 horas.

Figura 19- Solução contendo NaCl 1 M (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, EUA) e *Blocking reagent* (*Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido) diluídos em 30 mL de *Hybridization Buffer reagent* (*Healthcare*, Buckinghamshire, Reino Unido).



Fonte: Mata (2022)

Figura 20- Aplicação da solução na membrana para pré-hibridização.



Fonte: Mata (2022)

Figura 21- Membranas embaladas em invólucro de plástico prontas para a pré-hibridização.



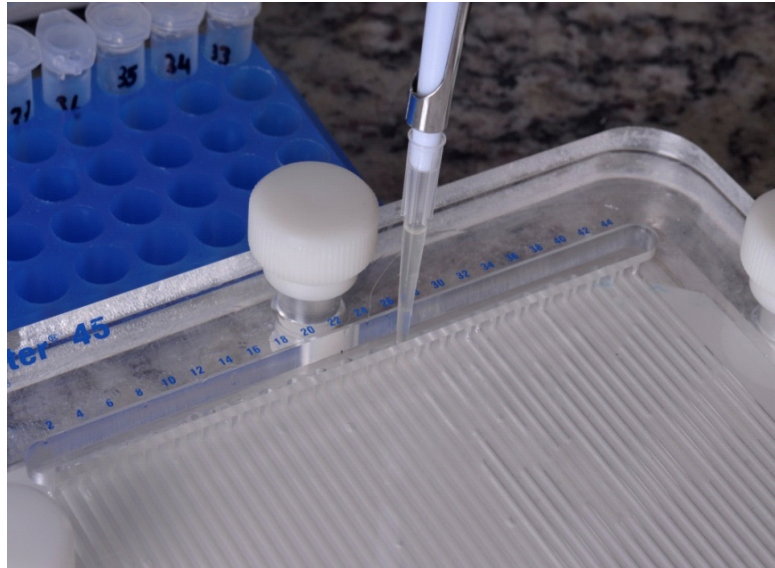
Fonte: Mata (2022)

3.10.5 Aplicação das sondas de DNA genômico marcadas e reação de hibridização

Após realização da pré-hibridização, as membranas foram posicionadas em um dispositivo de acrílico *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) para aplicação das sondas marcadas. O dispositivo possui 45 canaletas individuais de hibridização, o que permite a aplicação simultânea de até 45 sondas distintas. As membranas foram posicionadas de forma que as amostras de DNA previamente fixadas à membrana ficassem orientadas em um ângulo de 90° com as canaletas do *Miniblotter* 45, formando um xadrez (*Checkerboard*) no padrão de 30 (amostras de DNA e padrões de 10^5 e 10^6) x 45 (sondas genômicas).

As canaletas foram utilizadas de forma independente como uma câmara para reações de hibridização. As aplicações foram realizadas de forma individual no interior de cada canaleta com a quantidade de sonda pré-estabelecida. Após aplicação, o aparelho foi envolvido em filme PVC e embalado em saco plástico, evitando o ressecamento da membrana. A hibridização da membrana foi realizada a 63,5°C no forno de hibridização sob agitação suave, por 16 horas. No total, foram processadas seis membranas.

Figura 22- Aplicação das sondas de DNA genômico das 40 espécies selecionadas para o estudo nas canaletas do *Miniblotter* 45.



Fonte: Mata (2022)

Figura 23- Aparelho *Miniblotter* 45 envolvido em filme PVC para evitar o ressecamento da membrana no forno de hibridização.



Fonte: Mata (2022)

Figura 24- Forno de hibridização e agitação.

Fonte: Mata (2022)

3.10.6 Lavagem para remoção de sondas não hibridizadas

Finalizada a reação de hibridização, as membranas foram submetidas a um processo de lavagem para remoção das sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Foram realizadas duas lavagens de 30 minutos cada, em 67,5 °C, com 500mL de solução contendo Ureia 2M (Sigma Chemical Co.), Dodecil Sulfato de Sódio (DSD) 0,1% (Sigma Chemical Co.), NaHPO 50mM (pH=7; Sigma Chemical Co.), NaCl 50 mM (Sigma Chemical Co.), MgCl₂ 1M (Sigma Chemical Co.) e *Blocking Reagent* (GE Healthcare).

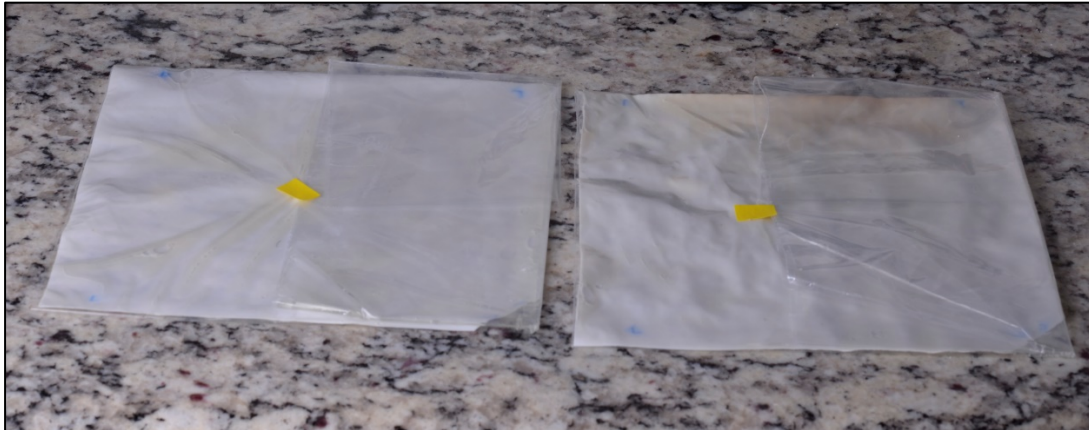
Em seguida, mais duas lavagens de 15 minutos, em temperatura ambiente, com 500mL de uma solução contendo Tris 1 M (Sigma Chemical Co.), NaCl 2 M (Sigma Chemical Co.), MgCl₂ 1M (Sigma Chemical Co.). Todas as lavagens foram realizadas sob vigorosa agitação.

3.10.7 Detecção dos sinais de hibridização

Para a detecção dos sinais de hibridização foi realizada uma reação de quimiluminescência. Posteriormente as lavagens, foram aplicadas 3 mL do reagente de detecção CDP-Star (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) sobre as membranas, deixando-o agir sobre a superfície da membrana por 30 minutos, protegido de luz.

Em sequência, o excesso de reagente foi removido e a membrana embalada com filme plástico de Policloreto de Vinila (PVC) para ser realizado o processo de exposição em cassete de autorradiografia.

Figura 25- Membranas prontas para a exposição.



Fonte: Mata (2022)

3.11 Exposição da membrana e revelação

Todas as membranas foram posicionadas individualmente no interior do cassete de autorradiografia (Hypercassete, Buckinghamshire, Reino Unido), em câmara escura, onde permaneceram em íntimo contato com filme para autorradiografia (Hyperfilm, GE Healthcare), por 16 horas. Finalizada essa etapa, os filmes foram processados em soluções de processamento radiográfico convencional (Kodak, Rochester, NY, EUA).

Ao final, foi obtido um filme radiográfico com os sinais de hibridização detectados pelas intersecções entre amostras e sondas, onde as linhas horizontais representam as sondas marcadas e as verticais as amostras do interior dos implantes, saliva inicial e final, configurando um “tabuleiro de xadrez” – DNA – *Checkerboard*.

Figura 26- Membrana posicionada para exposição em cassete de autorradiografia.

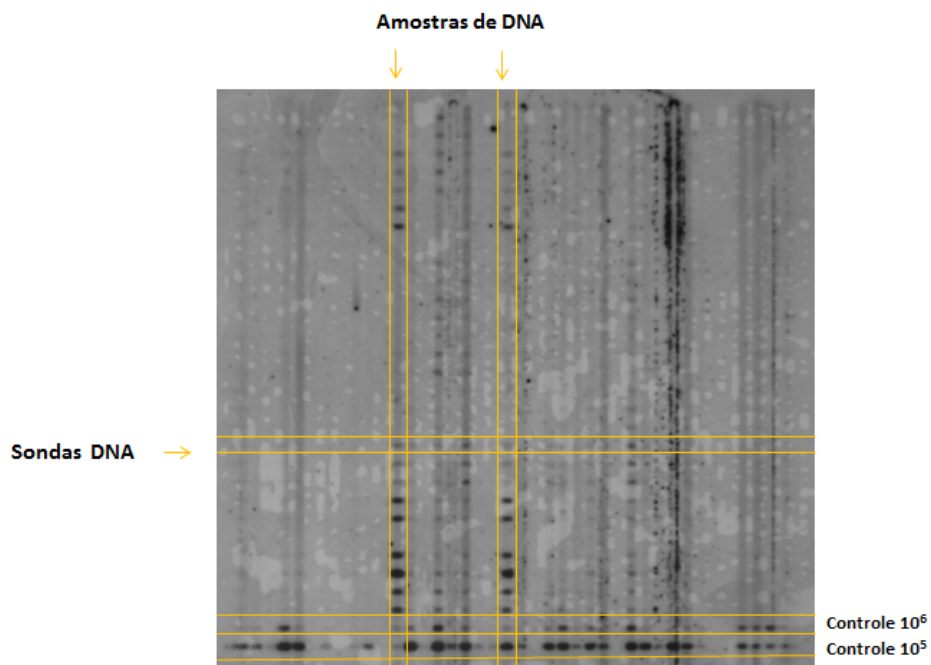


Fonte: Mata (2022)

3.12 Interpretação dos sinais de hibridização

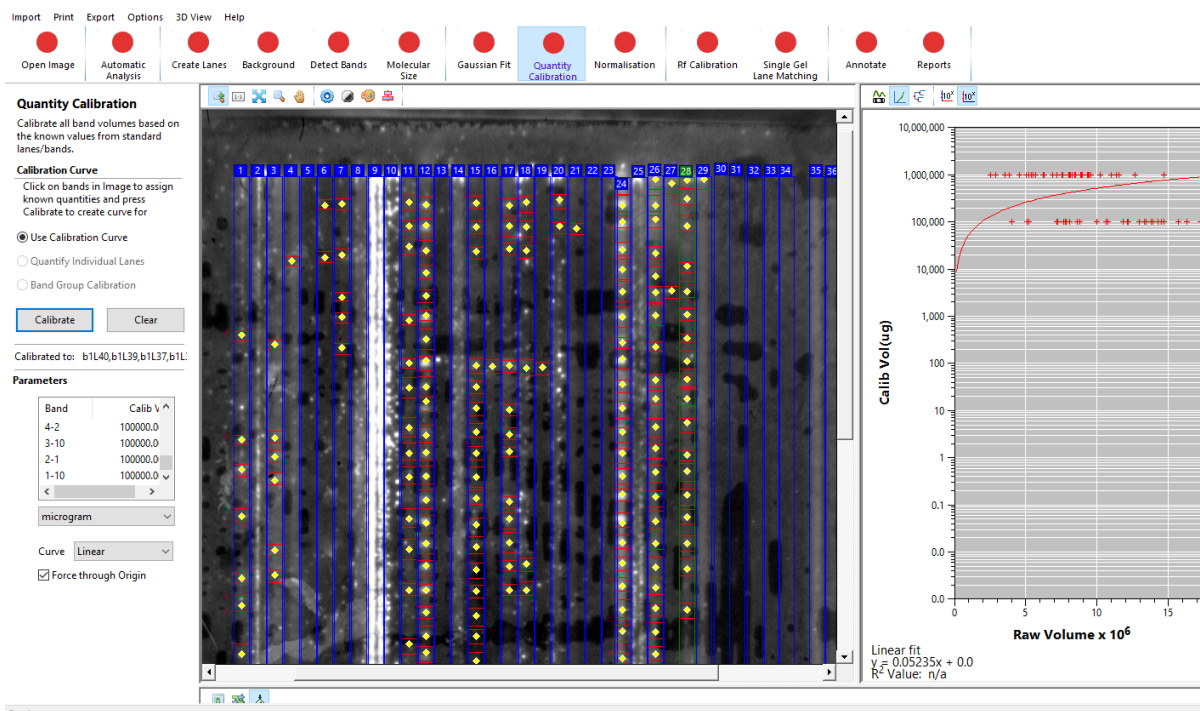
Os filmes radiográficos foram fotografados e as imagens obtidas analisadas no software CLIQS 1D (Totallab, Newcastle, Inglaterra), que possibilitou a determinação do número aproximado de células microbianas presentes em cada amostra, através da comparação de intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras contra as sondas marcadas em relação à intensidade dos padrões contendo 10^5 e 10^6 células de cada umas das 40 espécies-alvo.

Figura 27- Filme radiográfico com sinais de hibridização após exposição e revelação onde as linhas horizontais representam as sondas marcadas e as verticais as amostras do interior dos implantes e saliva inicial e final, configurando um “tabuleiro de xadrez” DNA – *Checkerboard*.



Fonte: Mata (2022)

Figura 28- Filme radiográfico analisado no software CLIQS 1D (Totallab, Newcastle, Inglaterra), que possibilitou a determinação do número aproximado de células microbianas presentes em cada amostra, a partir da comparação da intensidade dos sinais de hibridização.



Fonte: Mata (2022)

3.13 Análises dos dados

A análise descritiva dos dados foi realizada, incluindo os estimadores pontuais como médias e desvios padrão, e medianas e quartis (primeiro quartil - Q1 e terceiro quartil - Q3), conforme sua distribuição e variância dos erros experimentais. A normalidade dos dados foi verificada pela inspeção visual dos gráficos de densidade, histogramas e Q-Q plots, e confirmados pelo teste de significância de Shapiro-Wilk. A homoscedasticidade foi verificada pelo teste de Levene. Os dados referentes aos ensaios de afrouxamento dos parafusos foram analisados pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. A análise do efeito dos pilares e ensaios de termociclagem e carga cíclica sobre a contagem de micro-organismos foi realizada pelo método não-paramétrico e multifatorial de Brunner-Langer (Brunner, 2002) com ajuste de Bonferroni. Considerando-se o carácter multifatorial e de correlação dos dados microbiológicos, utilizou-se o modelo de estimação de equações generalizadas (*Generalized Estimating Equations* – GEE) para a comparação do perfil microbiano entre os grupos. Os dados foram processados com o auxílio do software estatístico R (R software, versão 4.1.0; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e as diferenças consideradas significantes para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Afrouxamentos dos parafusos dos pilares protéticos

Os valores referentes ao torque, retorque, destorque e porcentagem de afrouxamento dos parafusos dos pilares protéticos para cada um dos espécimes dos diferentes grupos investigados, após o ensaio de termociclagem e carregamento cíclico, podem ser observados nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1- Grupo CMC TB 4 CAD

Corpo de Prova	Torque	Retorque	Destorque	Afrouxamento
1	32	32	9,7	69,70%
2	32	32	0	100%
3	32	32	9,5	70%
4	32	32	5,2	83%
5	32	32	0	100%
6	32	32	7,2	77,5%
7	32	32	5,6	82%
8	32	32	16,7	47%
9	32	32	4,4	86%
10	32	32	7,7	76%

Tabela 2- Grupo CMX TB 4 CAD

Corpo de Prova	Torque	Retorque	Destorque	Afrouxamento
16	32	32	8,2	74%
17	32	32	9,2	71%
18	32	32	12,5	60%
19	32	32	13,8	56%
20	32	32	11	65%
24	32	32	22	31%
25	32	32	26	18%
26	32	32	30	6,25%
27	32	32	28	12,5%
28	32	32	23	28%

Tabela 3- Grupo CMX PU

Corpo de prova	Torque	Retorque	Destorque	Afrouxamento
31	32	32	38	0%
32	32	32	32	0%
33	32	32	0	100%
34	32	32	37	0%
35	32	32	30	6,25%
39	32	33	25	25%
40	32	32	0	100%
41	32	32	29	9%
42	33	32	24	25%
43	32	32	28	19%

Tabela 4- Grupo CMX U

Corpo de Prova	Torque	Retorque	Destorque	Afrouxamento
46	20	23	4,6	92%
47	20	20	17	15%
48	20	20	29	0%
49	20	20	1	95%
50	20	21	3	86%
54	20	20	1	95%
55	20	20	1	95%
56	20	20	2	90%
57	20	20	4	80%
58	20	20	1	95%

Os grupos investigados apresentaram diferenças significantes nos valores de perda de torque (ANOVA - seguido por teste de Tukey; $p < 0,005$). Na tabela 5, estão apresentadas as médias e significância estatística de perda de torque para cada um dos grupos investigados.

Tabela 5- Médias de perda de torque para os grupos em subconjuntos homogêneos. Diferenças significantes detectadas pelo teste Tukey HSD ($p < 0,05$).

Tukey HSD ^a	Grupos	N	1	2
	CMXTB	10	24,005867	
CMXPU	10	43,184858		43,184858
CMXU	10			68,571429
CMCTB	10			79,375000
	Sig.		0,615	0,114

O grupo CMC TB teve a maior porcentagem de afrouxamento do parafuso (79,37%), seguido pelos grupos CMX U e CMX PU, respectivamente, com taxas de 68,57 e 43,18%. O melhor desempenho entre os grupos analisados neste estudo foi do grupo CMX TB (Implante cone Morse cônico conectado ao pilar Base Tibase 4 CAD), que apresentou uma taxa de 24,00% de afrouxamento dos parafusos.

4.2 Avaliação da microinfiltração na interface implante/pilar

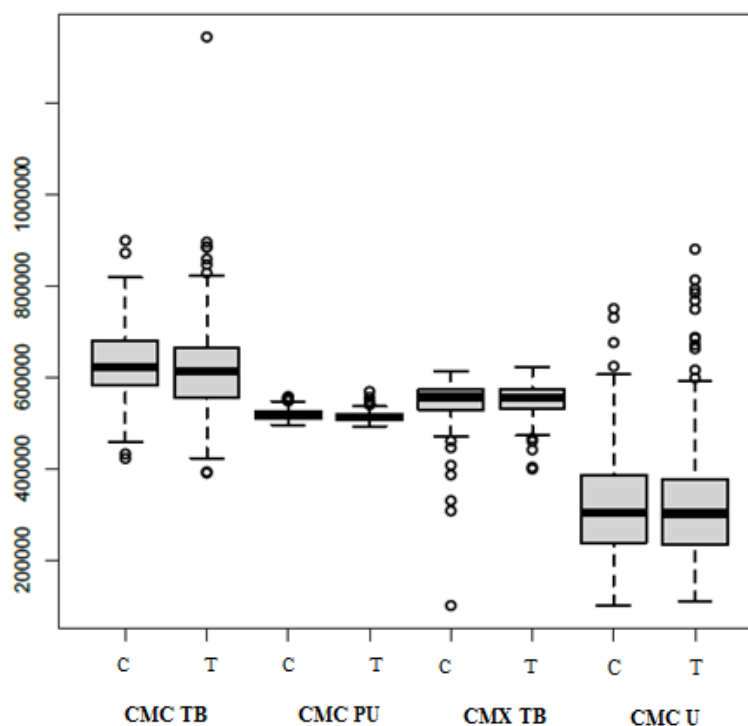
Nenhuma das amostras de controle negativo de todos os grupos avaliados, coletadas do interior dos implantes anterior ao teste de termociclagem e carga cíclica, mostrou resultados positivos de presença microbiana.

Após o ensaio de termociclagem e carga cíclica, todos os conjuntos implantes/pilares de todos os pilares investigados apresentaram a presença de micro-organismos, totalizando 2041551 genomas. O mesmo resultado foi observado para os pilares que foram submetidos somente ao ensaio térmico, com o total de 1997290 genomas. Entre os grupos submetidos à

termociclagem e carga cíclica, a mediana de contagem de genomas totais, seguindo a ordem do maior para o menor foi CMC TB (627805), CMX TB (572820), CMX PU (519282) e CMX U (321644). Entre os grupos submetidos apenas à termo ciclagem, as medianas foram CMC TB (617112), CMX TB (550809), CMX PU (513847) e CMX U (315522).

Os grupos investigados apresentaram diferenças significantes nos valores de contaminação (ANOVA; $p < 0,005$). A (figura – 30) ilustra os valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil das contagens de genomas totais das células microbianas proveniente das amostras coletadas no interior dos implantes e parafusos de fixação submetidos ou não à carga cíclica, enquanto nas (tabelas - 6 a 9) estão descritos os valores referentes à contagem individual de cada uma das 40 espécies-alvo avaliadas no estudo. Os menores valores registrados entre os grupos termociclagem e carga cíclica foi o grupo CMX U, enquanto os grupos CMC TB e CMX TB apresentaram os maiores valores (Tukey; $p < 0,005$). Entre os grupos da termociclagem o que apresentou melhor resultado também foi o grupo CMX U.

Figura 29 – Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil da quantificação de genomas totais das 40 espécies-alvo identificadas nas roscas do parafuso e interior do implante dos grupos submetidos ao carregamento cíclico (D) e a termociclagem (T).



Fonte: Mata (2022)

Tabela 6 - Grupo CMC TB. Mínimo (Min), 1º Quartil, mediana, média, 3º Quartil e máximo (Max) das 40 espécies- alvo detectadas nas roscas do parafuso e interior do implante.

	Ciclagem Térmica e Carga Cíclica						Ciclagem Térmica					
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
<i>Candida tropicalis</i>	499465	516712	534038	547554	557708	651489	400259	523034	537468	527930	542365	556524
<i>Candida glabrata</i>	471179	544496	602260	599857	615837	811410	431936	503807	561537	563680	621410	699708
<i>Candida dubliniensis</i>	475402	504454	539168	544929	567558	683705	512943	573779	595362	583010	604592	628377
<i>Candida albicans</i>	503754	514799	534297	552731	584323	649825	480652	512195	523533	551795	563133	679463
<i>S. pneumoniae</i>	504896	567937	597443	587463	621210	642731	595870	598772	612444	625121	638792	679728
<i>S. gallolyticus</i>	507870	546434	579044	587641	615521	697752	589889	638313	655077	644569	661366	678234
<i>V. parvula</i>	539243	590354	597497	606167	635940	658358	567120	585344	593449	588217	596322	598849
<i>T. denticola</i>	483362	578609	656805	660446	763000	828167	561773	586472	647304	653646	714479	758203
<i>T. forsythia</i>	558789	611798	683665	746543	755839	1344715	659659	704875	722092	723360	740576	789596
<i>S. sobrinus</i>	661538	699976	726574	750250	806908	895655	691838	786421	844923	820197	878699	899104
<i>S. sanguinis</i>	530248	594529	638470	651256	652013	819170	504070	633840	691386	651957	709502	720986
<i>S. salivarius</i>	542248	568458	622717	622594	704591	816027	583503	600370	649205	659604	708438	756500
<i>S. pasteurii</i>	480058	558181	602310	622594	704591	816027	587990	600285	619728	628646	648089	687136
<i>S. parasanguinis</i>	536446	5707749	629047	630151	667066	757201	550919	605175	636416	640084	671325	736586
<i>S. oralis</i>	474413	568393	652822	634822	704656	762701	530628	543113	591199	604967	653053	706844
<i>S. mutans</i>	487655	546186	620196	603589	658292	703153	457503	467810	509795	538970	580955	678787
<i>S. moorei</i>	567414	624352	644285	655223	660830	787577	566710	577428	638138	642531	703241	727137
<i>S. mitis</i>	479870	570950	608519	613243	623248	858306	574245	607696	630267	632519	655090	699222
<i>S. constellatus</i>	545565	555355	610398	637886	684581	885305	511381	556467	588400	574351	606284	609222
<i>S. aureus</i>	487191	540175	675949	635201	702206	769954	587478	594220	612905	652605	671291	797133
<i>P. putida</i>	516300	619464	650428	647966	698450	786884	558804	586594	633324	624951	671681	674352
<i>P. nigrescens</i>	501925	574848	610700	608865	637100	707094	587177	632085	655643	640732	664291	664466
<i>P. micra</i>	481842	597128	614948	614355	662351	635758	560538	605321	649838	638953	683470	695596
<i>P. melaninogenica</i>	581484	642451	656114	658453	679316	748853	525768	573214	651422	659362	737570	808836
<i>P. intermedia</i>	515419	567509	622782	613075	654738	692820	422016	459808	558247	563794	66223	716664
<i>P. gingivalis</i>	537493	574899	620351	613752	651885	690923	583254	612617	648828	643132	679342	691620
<i>P. endodontalis</i>	509354	575225	616594	608420	649087	685654	565105	566852	577432	577239	587819	588988
<i>P. anaerobius</i>	537745	568076	600039	607396	624819	715654	598955	599954	610824	613199	624069	632193
<i>P. aeruginosa</i>	481647	582853	640709	624453	681893	751444	565730	591237	599990	606724	615477	661188
<i>M. salivarium</i>	514754	551419	610696	594794	631804	662789	537426	538582	555831	577334	594583	660247
<i>K. pneumoniae</i>	478531	542816	599017	589771	634740	681970	511323	573528	616948	618669	662088	729458
<i>F. nucleatum</i>	390358	509930	539019	552677	624528	662581	629171	632180	655032	657829	680680	692081
<i>E. faecalis</i>	449873	524863	540289	551201	589501	656899	615639	663619	684774	675718	696873	717685
<i>E. corrodens</i>	392714	578014	610590	580026	627132	684806	567392	586274	666448	662937	743111	751458
<i>C. rectus</i>	423191	526447	663110	615102	676448	752398	612597	633473	640603	647565	654695	696458
<i>C. gengivalis</i>	474206	591170	650446	641002	674923	787770	608877	628253	668521	667024	707292	722178
<i>B. fragilis</i>	508267	546144	620278	609245	668141	693737	560138	637204	666793	647105	676692	694699
<i>Aaa</i>	476387	569010	612387	615976	632509	521162	521162	571564	633465	622224	685226	698605
<i>C. coli</i>	451384	571859	626636	607283	672237	707912	602417	614768	632057	635732	653021	676396
<i>L. casei</i>	565001	581528	646157	638162	683994	724165	479441	588346	646438	624235	682327	724623

O método de Equações de Estimações Generalizadas (GEE) mostrou haver diferenças significantes nas contagens das diferentes espécies-alvo do estudo entre os grupos após o ensaio de carga cíclica ($p < 0,05$). Conforme descrito na tabela 10, os micro-organismos com maiores contagens encontrados no grupo CMC TB submetidos à ciclagem térmica e carga cíclica foram: *S. sobrinus* (750250); *T. forsythia* (746543); *T. denticola* (660446); *P. melaninogenica* (658453); *S. moorei* (655223) e *S. sanguinis* (651256). Entre os grupos submetidos à ciclagem térmica, as maiores contagens foram para *S. sobrinus* (820197); *T. forsythia* (723360); *E. faecalis* (675718), *C. gengivalis* (667024); *E. corrodens* (662937); *P. melaninogenica* (659362).

Tabela 7 - Grupo CMX TB. Mínimo (Min), 1º Quartil, mediana, média, 3º Quartil e máximo (Max) das 40 espécies- alvo detectadas nas roscas do parafuso e interior do implante.

	Ciclagem Térmica e Carga Cíclica						Grupo Térmico					
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
<i>Candida tropicalis</i>	496592	515731	526960	525193	53851°	548276	489379	506751	512887	516540	522676	551008
<i>Candida glabrata</i>	518446	527305	534480	538439	542217	582655	501586	508209	515254	527091	534136	576270
<i>Candida dubliniensis</i>	477982	517257	529519	525692	545424	565209	470631	490024	512224	506412	528612	530569
<i>Candida albicans</i>	473474	494370	523611	516886	529699	572128	492392	499021	510583	517413	528993	556093
<i>S. pneumoniae</i>	482061	508639	522327	518340	537917	544420	487890	500679	533283	531922	564526	573230
<i>S. galloyticus</i>	399066	507491	528371	520918	554330	565274	489946	498905	521177	525008	547280	567733
<i>V. parvula</i>	512181	526347	536916	531959	540894	542268	386188	452881	487084	477951	512154	551449
<i>T. denticola</i>	543743	558818	563354	568994	572934	613872	542853	560909	569516	565391	573999	579678
<i>T. forsythia</i>	532057	543820	560373	561235	580801	585616	507034	530541	550539	552844	572841	603264
<i>S. sobrinus</i>	519783	537888	549026	551081	557541	610955	569753	573052	577485	580099	584533	595673
<i>S. sanguinis</i>	473787	514390	533482	531100	554510	580375	329607	416505	477452	468591	529538	589852
<i>S. salivarius</i>	475515	525172	534335	530916	544926	559998	515742	518324	531689	533916	547281	556545
<i>S. pasteurii</i>	459655	494762	521916	516966	540400	560938	481242	485587	491090	489862	495364	496024
<i>S. parvaanguinis</i>	551532	555873	560776	562206	564969	583635	522089	535622	548198	544030	556606	557635
<i>S. oralis</i>	547741	547741	557186	566023	570717	583620	561110	569979	578776	580457	588353	604966
<i>S. mutans</i>	521082	545371	571449	563677	582176	597851	548784	551513	561157	565602	575245	591308
<i>S. moorei</i>	506457	554874	565164	560009	573283	599603	544476	549398	560877	564643	576123	592343
<i>S. mitis</i>	526259	533981	548766	555798	574910	595837	100000	426065	535121	428344	537400	543136
<i>S. constellatus</i>	527892	560203	569269	566945	574598	592919	547831	562346	567613	563918	569184	572616
<i>S. aureus</i>	548861	556266	563362	564513	574890	578580	526178	569788	584634	571746	586592	591541
<i>P. putida</i>	500590	541112	549882	547336	560674	585879	503974	527182	537623	537638	548080	571334
<i>P. nigrescens</i>	532600	545662	557655	564862	588724	594985	555658	556225	561188	566100	566562	568365
<i>P. micra</i>	402709	550502	561360	543071	568187	622768	307382	493785	557719	501157	565090	581808
<i>P. melaninogenica</i>	495919	555366	562177	563158	575509	613968	534323	539015	545649	549336	555970	571724
<i>P. intermedia</i>	544669	557460	569073	571801	580986	613662	564974	569463	571896	572860	575293	582673
<i>P. gingivalis</i>	489725	504471	535813	527119	546902	554464	507347	518645	536165	538127	555646	572833
<i>P. endodontalis</i>	441086	486754	502020	496015	507733	529601	407109	447178	468629	476382	497832	561159
<i>P. anaerobius</i>	479681	521592	532805	539360	537340	573804	529878	549986	559938	553762	563714	565295
<i>P. aeruginosa</i>	503678	522435	562092	553281	578722	601961	556387	557108	557552	563401	563845	582113
<i>M. salivarium</i>	521811	535519	565304	558432	574149	591321	541602	559289	572156	567911	580778	585729
<i>K. pneumoniae</i>	542472	568314	577548	581477	595568	617113	559294	566629	570637	578279	582288	612548
<i>F. nucleatum</i>	560132	564347	570906	575682	581220	619010	543114	547686	557899	559287	569501	578237
<i>E. faecalis</i>	545878	564308	576484	573064	581512	603714	557411	560442	562146	569102	570806	594704
<i>E. corrodens</i>	552590	568619	579075	578317	587834	608508	567342	567979	578663	578561	589245	589577
<i>C. rectus</i>	532558	561741	575519	577864	593144	615889	544577	565388	572980	569702	577294	588274
<i>C. gengivalis</i>	537625	545711	556653	559280	571189	583272	521654	542848	556176	553238	566565	578945
<i>B. fragilis</i>	514676	553184	567165	562438	573858	600250	558006	567206	572172	575094	580060	597996
<i>Aaa</i>	520565	531841	549008	548850	565558	580608	534334	535150	540761	547236	552847	573088
<i>C. coli</i>	528294	553992	561322	558542	572180	575593	553865	565098	575156	571711	581769	582669
<i>L. casei</i>	531608	573140	583355	580824	595654	604658	551711	557724	57660	576619	596555	599446

Conforme descrito na tabela 11, os micro-organismos com maiores contagens encontrados no grupo CMX TB submetidos à ciclagem térmica e carga cíclica foram: *K. pneumoniae* (581477); *L. casei* (580824); *E. corrodens* (578317); *C. rectus* (577864); *F. nucleatum* (575682) e *E. faecalis* (573064). Entre os grupos submetidos à ciclagem térmica, as maiores contagens foram para *S. oralis* (580457); *S. sobrinus* (580099); *E. corrodens* (578561); *K. pneumoniae* (578279); *L. casei* (576619) e *B. fragilis* (575094).

Tabela 8- CMX PU. Mínimo (Min), 1º Quartil, mediana, média, 3º Quartil e máximo (Max) das 40 espécies- alvo detectadas nas roscas do parafuso e interior do implante.

	Ciclagem Térmica e Carga Cíclica						Grupo Térmico					
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
<i>Candida tropicalis</i>	521879	526899	532735	535348	540132	568524	532127	544172	550925	546923	553676	553717
<i>Candida glabrata</i>	509069	519093	521232	524599	531062	547197	523553	523558	527277	528696	532414	536675
<i>Candida dubliniensis</i>	502067	511557	515934	516141	522602	525501	523273	524197	524826	525243	525872	528050
<i>Candida albicans</i>	505054	517696	520209	519744	524708	529092	518324	519122	521380	521729	523987	525834
<i>S. pneumoniae</i>	508163	509542	517133	518351	524156	535767	505438	512514	516580	517004	521070	529418
<i>S. galloyticus</i>	508370	511941	512435	514700	515767	524863	512751	517757	520574	519627	522444	524608
<i>V. parvula</i>	498994	505425	510424	509845	514491	519270	509489	511837	512774	515817	516755	528232
<i>T. denticola</i>	492806	510774	518132	517028	525095	540757	509681	510765	526990	524016	530242	532403
<i>T. forsythia</i>	505347	519426	522475	524148	529123	547926	510002	515201	521239	525246	531285	548505
<i>S. sobrinus</i>	595786	510908	515635	520340	535644	541346	516657	519578	522600	526706	529727	544967
<i>S. sanguinis</i>	499460	506609	509465	511159	514431	525458	511951	514355	515938	525292	526876	557342
<i>S. salivarius</i>	499330	507500	512509	511075	515363	519720	506010	507446	500883	508136	509200	509516
<i>S. pasteurii</i>	502444	507500	512509	511075	515363	519720	506276	513591	516103	519186	521698	538260
<i>S. parasanguinis</i>	506311	506901	507235	510155	510431	523784	509446	512415	516258	521968	525811	545913
<i>S. oralis</i>	502672	503168	507264	513903	516239	556053	509773	512126	519338	519623	526834	530043
<i>S. mutans</i>	502274	506689	509707	509551	510936	518002	510262	511036	513776	523327	526067	555495
<i>S. moorei</i>	502459	506118	508818	509641	512814	521343	495690	504196	512701	514469	523858	535015
<i>S. mitis</i>	496140	508397	512622	510891	516285	521740	509202	512173	515134	515491	518452	522494
<i>S. constellatus</i>	499229	504608	513249	510944	515374	520901	502799	507690	510825	517339	520474	544905
<i>S. aureus</i>	502340	506297	513276	512750	516756	524366	503241	510870	515086	518742	522958	541558
<i>P. putida</i>	502727	509252	512796	516473	520938	540759	513027	515250	519531	525870	530151	551392
<i>P. nigrescens</i>	499713	505889	514311	513822	521081	526972	508985	509206	512414	515173	518382	526878
<i>P. micra</i>	499866	509486	514798	513336	518662	519904	495886	505933	514731	514545	523343	532833
<i>P. melaninogenica</i>	516074	519036	521372	520954	522910	526552	515292	524258	528527	527933	532202	539287
<i>P. intermedia</i>	492805	510600	512890	512164	518208	520554	502698	512800	516485	522552	525937	553340
<i>P. gingivalis</i>	496318	510253	513687	514056	519108	525049	506885	508754	511323	521321	523890	555753
<i>P. endodontalis</i>	500108	507253	510450	510585	513594	522991	510414	512129	514838	518472	521181	533797
<i>P. anareobius</i>	499789	508881	513569	512332	518974	521314	510178	512684	513693	521200	522209	547236
<i>P. aeruginosa</i>	502333	504190	506289	508465	512226	517909	499685	504556	515162	514296	524903	527176
<i>M. salivarium</i>	502480	503394	508459	508819	513308	517638	505885	509168	512009	513433	516273	523829
<i>K. pneumoniae</i>	503118	507107	509697	510426	514686	517074	512896	515614	516578	517487	518450	523895
<i>F. nucleatum</i>	496246	509891	513442	512987	517171	529364	506459	506717	511210	512268	516762	520195
<i>E. faecalis</i>	502648	509671	516600	513598	517098	523633	503046	508314	511641	510392	513718	515240
<i>E. corrodens</i>	499102	507130	511786	510290	514304	517051	502761	507881	511606	513627	517352	528535
<i>C. rectus</i>	503240	504524	508209	509771	513324	521964	503162	506076	508482	511234	513640	524809
<i>C. gengivalis</i>	496277	509774	508597	511429	518305	525247	500159	502528	510465	512300	520237	528113
<i>B. fragilis</i>	500472	506942	508975	508685	511356	515116	507329	509377	514210	515172	520005	524938
<i>Aaa</i>	500329	504265	510794	510960	513583	530871	503189	506050	510544	512296	516790	524905
<i>C. coli</i>	499754	506396	513786	511665	516312	521797	510199	510906	513822	515704	518620	528620
<i>L. casei</i>	496075	507173	509809	510831	515268	523264	502363	508030	511699	513208	516876	527070

Conforme descrito na tabela 12, os micro-organismos com maiores contagens encontrados no grupo CMX PU submetidos à ciclagem térmica e carga cíclica foram: *C. tropicalis* (535348); *C. Glabrata* (524599); *T. forsythia* (524148); *P. melanogenica* (520954); *S. sobrinus* (520340); *C. albicans* (519744). Entre os grupos submetidos à ciclagem térmica, as maiores contagens foram para *C. tropicalis* (546923); *C. Glabrata* (528696); *S. sobrinus* (526706); *P. putida* (525870); *T. forsythia* (525246) e *C. dubliniensis* (525243).

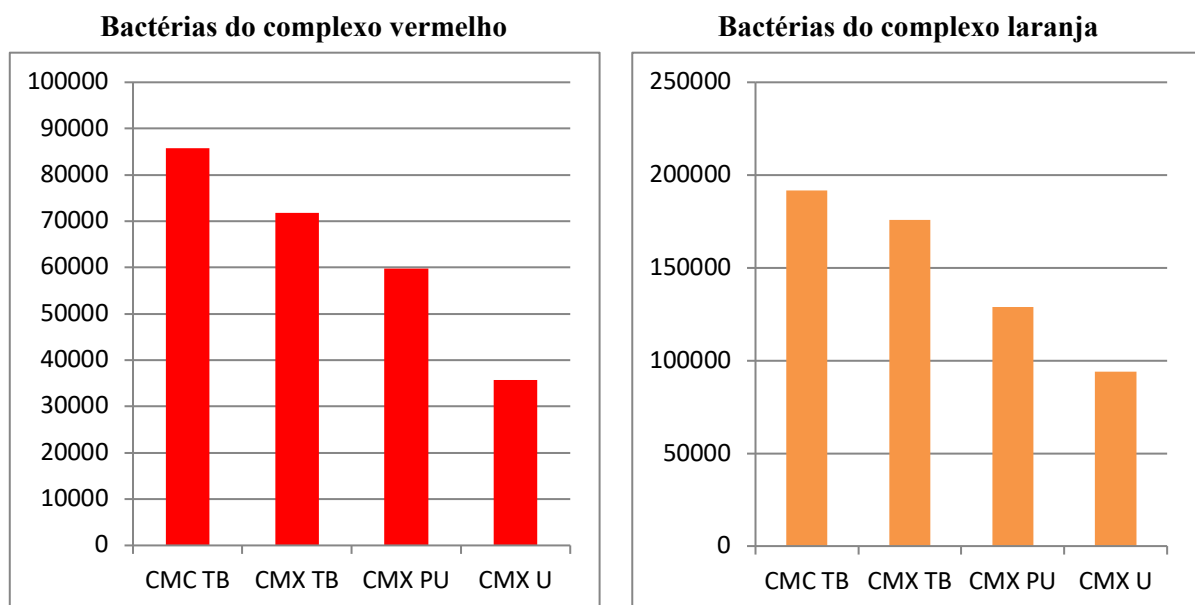
Tabela 9 - CMX U. Mínimo (Min), 1º Quartil, mediana, média, 3º Quartil e máximo (Max) das 40 espécies- alvo detectadas nas roscas do parafuso e interior do implante.

	Ciclagem Térmica e Carga Cíclica						Grupo Térmico					
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
<i>Candida tropicalis</i>	217282	341234	385222	378850	439730	465562	219254	254462	352510	348994	447041	471700
<i>Candida glabrata</i>	225313	246065	262678	268364	290845	327597	184674	227776	250716	242263	265203	282946
<i>Candida dubliniensis</i>	285913	327206	331453	348002	345835	478154	327498	385702	411369	434964	460630	589619
<i>Candida albicans</i>	110375	224104	288444	272661	316789	380726	301789	358219	384111	378853	404745	445398
<i>S. pneumoniae</i>	109486	143622	259004	233199	287371	383126	100000	212150	365828	359290	512968	605506
<i>S. gallolyticus</i>	217038	233505	290082	313556	333302	586911	141288	193417	258145	260751	325479	385428
<i>V. parvula</i>	143606	278304	338548	309169	369346	383873	124813	209168	261543	248175	300550	344799
<i>T. denticola</i>	109853	224276	271285	260355	327284	362279	192606	202036	221284	223541	242789	258989
<i>T. forsythia</i>	116516	228361	263827	262679	296038	402735	193887	202409	235870	239400	272860	291973
<i>S. sobrinus</i>	110479	228074	277931	275089	336756	397246	262909	288476	299820	301256	312601	342476
<i>S. sanguinis</i>	186712	260753	319200	311340	372454	413536	158952	265727	369944	424695	439865	439895
<i>S. salivarius</i>	183190	261160	289836	281151	298268	368143	220188	250046	279214	274872	304040	320874
<i>S. pasteurii</i>	252142	287569	293603	301347	300692	396385	144374	170950	199114	230808	258973	380631
<i>S. parva</i>	112858	210692	301458	281694	341119	399906	243447	275141	303708	295559	324126	331372
<i>S. oralis</i>	280561	351924	391391	390849	409087	528500	297603	305743	328975	360780	384012	487569
<i>S. mutans</i>	227850	290089	313220	311207	376317	407205	188905	277723	322566	301035	345877	370103
<i>S. moorei</i>	109937	189142	243573	228104	268104	306521	223630	258245	289429	283920	315104	333192
<i>S. mitis</i>	150640	185939	215018	243150	313548	376590	154386	206231	262503	252076	308348	328913
<i>S. constellatus</i>	145954	188560	226072	250585	328127	365342	193170	216380	225202	227024	235847	264521
<i>S. aureus</i>	187880	262263	280057	291265	302379	408494	226065	308542	370618	363374	425451	486196
<i>P. putida</i>	143161	253023	322618	309755	368265	455233	297895	306702	363186	366827	423311	443041
<i>P. nigrescens</i>	177730	207023	266496	277380	353889	397399	321529	362934	386017	442321	465404	675723
<i>P. micra</i>	189217	190844	207689	224872	243638	334089	185569	265603	299005	277407	310809	326048
<i>P. melaninogenica</i>	448694	514857	561123	591295	652611	880154	566416	582489	605760	632014	655285	750119
<i>P. intermedia</i>	156879	225608	287838	340493	383084	812934	207091	244818	320549	314632	390363	410339
<i>P. gingivalis</i>	117124	264842	272863	298062	369196	496776	263035	268326	281348	302660	315681	384908
<i>P. endodontalis</i>	110453	233541	284995	268700	331040	345795	147782	176117	204091	242392	270366	413606
<i>P. anareobius</i>	151960	225042	265177	263778	293364	405937	146384	230859	280924	279409	329475	409404
<i>P. aeruginosa</i>	227437	239907	290105	308114	377696	413180	225416	225727	246442	273559	294274	375936
<i>M. salivarium</i>	187273	247973	341173	333144	415076	469885	309088	333366	364032	365248	395914	423843
<i>K. pneumoniae</i>	195112	282004	404784	402078	450658	783747	232059	260969	348822	358690	446544	505059
<i>F. nucleatum</i>	150975	272399	305683	303963	341448	454396	235202	263872	306925	317749	368002	421946
<i>E. faecalis</i>	186020	274720	341316	325884	396734	420810	309552	331993	360781	353452	382240	382694
<i>E. corrodens</i>	231374	281719	336372	366000	409572	574781	230021	282075	343949	333581	395455	416406
<i>C. rectus</i>	328256	351452	426916	477979	581944	767913	115174	209127	361902	343182	495957	533751
<i>C. gengivalis</i>	233038	310492	342198	425489	541128	748697	236263	260985	287295	320936	347246	472891
<i>B. fragilis</i>	277918	292194	3550285	408566	432525	792708	348069	370687	402494	470874	502680	730439
<i>Aaa</i>	110516	268966	287284	296592	338523	427716	148299	178126	229103	244087	295064	369845
<i>C. coli</i>	147005	230240	268391	279505	346504	389418	268353	293782	306211	329242	335372	410996
<i>L. casei</i>	147514	282125	345747	319614	377600	387103	147246	233982	322463	322463	346930	595550

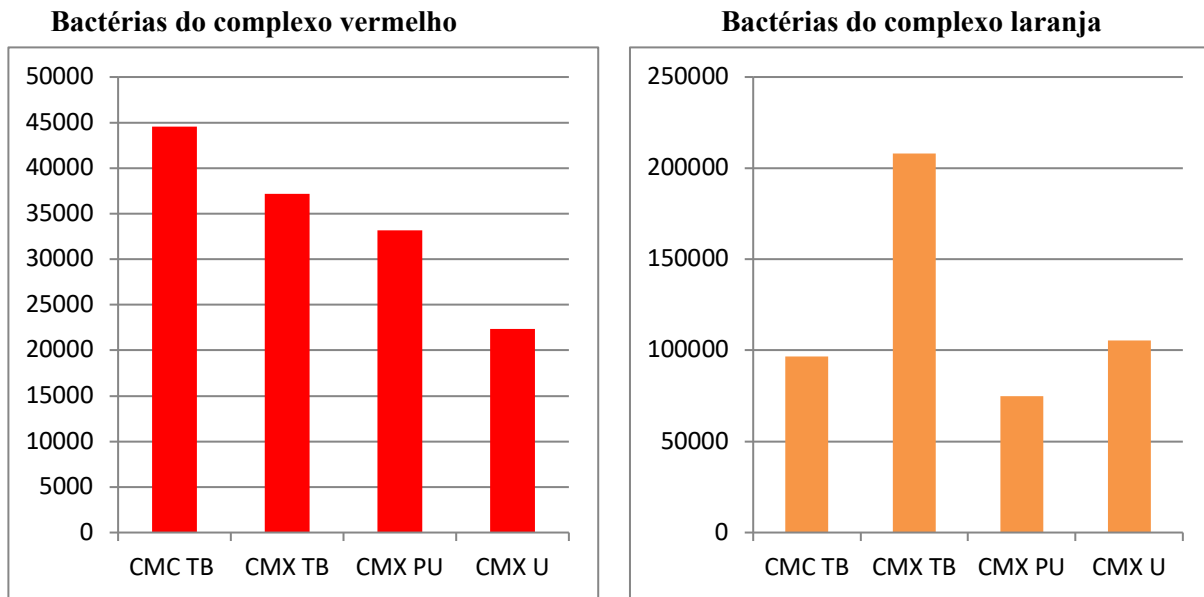
Conforme descrito na tabela 13, os micro-organismos com maiores contagens encontrados no grupo CMX U submetidos à ciclagem térmica e carga cíclica foram: *P. melaninogenica* (591295); *C. rectus* (477979); *C. gengivalis* (425489); *B. fragilis* (408566); *K. pneumoniae* (402078) e *S. oralis* (390849). Entre os grupos submetidos à ciclagem térmica, os micro-organismos com maiores contagens foram *P. melaninogenica* (632014); *B. fragilis* (470874); *P. nigrescens* (442321); *Candida dubliniensis* (434964); *Candida albicans* (378853) e *P. putida* (366827)

As (Figuras 30 e 31) ilustram a distribuição das espécies bacterianas dos complexos vermelho e laranja de Socransky (Socransky et al. 1998), respectivamente, nos grupos investigados submetidos ou não à carga cíclica.

Figura 30- Contagem de bactérias (genomas totais) após o ensaio de carga cíclica.



Fonte: Mata (2022)

Figura 31- Contagem de bactérias (genomas totais) após o ensaio de ciclagem térmica.

Fonte: Mata (2022)

Os resultados observados indicam que a quantidade de genomas bacterianos do complexo vermelho detectados nos grupos após o ensaio de carga cíclica foi bem superior à quantidade observada nos grupos submetidos somente ao ensaio de termociclagem. Entretanto, o padrão de distribuição dos genomas nos grupos é semelhante, com os maiores valores sendo observados para o grupo CMC TB e os menores para os grupos CMX U.

Já para os micro-organismos pertencentes ao complexo laranja, a quantidade de genomas observados nas duas situações experimentais, com ou sem carga, foi semelhante. Porém, o perfil de distribuição entre os grupos foi diferente nas duas situações; para os grupos submetidos ao ensaio de carga cíclica, o padrão foi similar ao do complexo vermelho, com as maiores contagens observadas para o grupo CMC TB, seguido por CMX TB, CMX PU e CMX U. Já para os grupos submetidos somente ao ensaio de termociclagem, o padrão foi bem diferente, com o grupo CMX TB apresentando uma contagem bem maior de genomas totais, quando comparado aos demais grupos que foram semelhantes.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido para investigar o afrouxamento do parafuso do pilar protético e seu potencial efeito sobre a micro-infiltração de micro-organismos por meio da interface implante/pilar protético, antes e após ciclagem térmica associada ou não à carga cíclica, em implantes de conexão cônica com diferentes tipos de pilares protéticos. Para isso, os conjuntos implantes/pilares protéticos foram submetidos ao ensaio de carga cíclica simulando a mastigação humana, e a técnica de hibridização *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi utilizada para identificar e quantificar a presença de até 40 espécies microbianas que comumente colonizam a cavidade oral, incluindo bactérias e fungos que são associados aos processos inflamatórios que originam as doenças periodontais e peri-implantares.

Os sistemas de implantes dentários são convencionalmente comercializados em duas peças: implante e o componente protético (pilar) que se adapta ao implante e recebe a reabilitação protética. Estudos apontam a conexão cônica como a de melhor desempenho mecânico/biológico quando comparada aos demais tipos de conexões existentes. A junção entre essas duas peças, mesmo que muito bem adaptada, resulta em espaços que podem favorecer a colonização e multiplicação dos micro-organismos presentes na cavidade oral (Teixeira et al., 2011; Passos et al., 2013; Do Nascimento et al., 2015). Os resultados apresentados neste estudo demonstram que todos os tipos de pilares e implantes investigados mostraram a passagem de micro-organismos por meio da interface, mesmo quando não submetidos ao ensaio de carga cíclica. Apesar dos avanços com os implantes dentários e suas conexões, a ocorrência de infiltração microbiana por meio desta interface é esperada, uma vez que o tamanho dos espaços relatados na literatura pode variar entre 0,1 a 10 μm e o diâmetro médio das menores bactérias presentes na cavidade oral varia entre 0,2 a 1,5 μm de largura e 2 a 10 μm de comprimento (Love et al., 2002; De Sousa et al., 2020; Do Nascimento et al., 2015; Passos et al., 2013; Cosyn et al., 2011; Schmitt et al., 2014). Adicionalmente, os micro-movimentos que ocorrem entre os componentes como resultados do afrouxamento dos parafusos de conexão em função da ação da carga mecânica, favorecem a abertura dos espaços já existentes (Vélez et al., 2020; Quek et al., 2006; Carinci et al., 2019; Tsurata et al., 2018). Desta forma, a hipótese alternativa estabelecida para este estudo foi confirmada, uma vez que existiram diferenças significativas nos valores de afrouxamento dos parafusos e do perfil microbiano para os diferentes grupos investigados.

Diante do exposto, a discussão a seguir será apresentada em duas partes: Afrouxamento do parafuso do pilar protético e Micro-infiltração na interface implante/pilar protético.

5.1 Afrouxamento do parafuso do pilar protético

De acordo com Kano et al. (2006) e Berbel et al. (2018), o torque inicial aplicado é perdido mesmo quando o parafuso do pilar não é submetido à aplicação de força externa. A explicação para esse evento está na acomodação ou relaxamento de inclusão do parafuso na conexão implante-pilar protético, denominada efeito de sedimentação (Jorge et al., 2013; Bello et al., 2021). Como a usinagem não deixa a superfície de contato entre o parafuso e o implante perfeitamente liso, os pontos altos serão as únicas superfícies de contato quando o torque inicial for aplicado, podendo resultar em um futuro afrouxamento (Vinhas et al., 2020). Para evitar diminuição no torque, preconiza-se reapertar o parafuso após 10 minutos da aplicação de força inicial (Bello et al., 2021).

Utilizando o protocolo dos autores acima, o torque de confirmação (retorque) foi aplicado. Ao analisar os pilares protéticos individualmente, antes de serem submetidos à termociclagem e carga cíclica, não foram observadas perdas de torque inicial ao ser realizado o retorque. Os valores de torque e retorque aplicado após 10 minutos mostraram-se semelhantes nos pilares. Diferente dos nossos achados, Bello et al. (2021) encontraram diferenças significantes entre o torque inicial e o retorque. Essa diferença de resultados pode ser justificada pela diferença no *desing* e material dos pilares e parafusos, diâmetro dos parafusos, torque de aperto e velocidade dos controladores utilizados nos estudos (Jörnégus et al., 1992; Lang et al., 2001; Lang et al., 2004; Delben et al., 2011).

Está consolidado na literatura que o afrouxamento do parafuso do pilar é um dos principais problemas mecânicos enfrentados pelas próteses implanto-suportadas, com um percentual variado (Bulaqi et al., 2015, Do Nascimento et al., 2015; Berbel et al., 2018; Alsubaiy et al., 2020). Todos os grupos deste estudo apresentaram afrouxamento do parafuso após termociclagem e aplicação de carga cíclica. De forma similar aos nossos resultados, De Oliveira et al. (2017); Silva et al. (2021); Jorge et al. (2012) e Alsubaiy et al. (2020) também observaram altas taxas de afrouxamento após a aplicação de carga cíclica. Jorge et al. (2013) e Silva et al. (2021) encontraram variação de 2 a 50% no afrouxamento dos parafusos dos pilares analisados, convergindo com os valores percentuais médios encontrados nos grupos CMX TB = 24,01% e CMX PU= 43,18% deste estudo.

A porcentagem de afrouxamento encontrada nos grupos CMC TB e CMX U foram elevados comparado aos estudos de Jorge et al. (2013) e Silva et al. (2021), possivelmente devido a diferenças metodológicas, uma vez que os estudos supracitados não ultrapassaram 1 milhão de ciclos, enquanto o presente estudo utilizou 2 milhões de ciclos mastigatórios. Desta forma, o uso dos pilares CMX TB e CMX PU sobre implantes de conexão cônica sugerem bons resultados quanto ao afrouxamento na simulação de 2 milhões de ciclos mastigatórios.

O afrouxamento do parafuso além de causar todos os problemas já discutidos, pode resultar em sua fratura (Martin et al., 2001; Vetromilla et al., 2019). No presente estudo, não foram encontradas fraturas nos parafusos, porém, dos 40 corpos de prova submetidos à termociclagem e carga cíclica, foi encontrado o afrouxamento total de 4 parafusos, 2 no grupo CMC TB e 2 no grupo CMX PU.

Um importante ponto a ser analisado são as forças mastigatórias, que em um sujeito adulto com dentição natural e com reabilitação protética estão, respectivamente, entre 46,6 N a 600 N (Gu et al., 2021; Zhou, et al., 2022). No presente estudo, adotou-se 2×10^6 ciclos com força de 120N compatível a carga de um molar permanente Moneburg & Proschel (2002) nos movimentos de oclusão, desocclusão e lateralidade. Entretanto, Moneburg & Proschel (2002) relataram que nos movimentos de lateralidade as forças incididas nas próteses implantossuportadas são em média 25 N, desta forma, em uma mastigação normal, movimentos de lateralidade não são executados com a carga de 120 N.

Carga axial superior à média encontrada dentro dos padrões de normalidade da mastigação, pode ser sugerido como um fator influenciador no afrouxamento dos parafusos de retenção de todos os grupos, uma vez que cargas não axiais podem gerar o afrouxamento do parafuso (Lages et al., 2017; Barbosa et al., 2020; Bagegni et al., 2022)

Os achados da literatura sugerem o afrouxamento do parafuso como um evento multifatorial, pois mesmo em conexões cônicas ele acontece e está associado a outros fatores como material do pilar e parafuso, usinagem, rugosidade das superfícies, desenho dos pilares, forças oclusais, pré-carga insuficiente, efeito de sedimentação, ajuste passivo dos elementos protéticos entre outros (Seloto et al., 2018; Alsubaiy et al., 2020; ; Vetromilla et al., 2019).

5.2 Micro-infiltração na interface implante/pilar protético

Embora as conexões do tipo cone morse sejam consideradas as mais estáveis e com melhor vedamento entre os componentes dos implantes (Chapman & Grippo 1996; Muftu" & Chapman 1998; Bozkaya & Muftu" 2004; Dibart et al., 2005), a presença de micro-organismos colonizando o interior dos implantes tem sido reportado com frequência na

literatura, mesmo em ensaios experimentais com ausência de aplicação de carga (Aloise et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Nogueira et al., 2012; Teixeira et al., 2015). No presente estudo, todos os conjuntos investigados apresentaram micro-organismos que penetraram por meio da conexão implante/pilar, tanto no ensaio de termociclagem sem carga quanto no ensaio de termociclagem associado à carga cíclica, onde, conforme esperado, foram observadas as maiores contagens de micro-organismos. A interface implante-pilar neste tipo de conexão tem ajuste por fricção e quando esse conjunto é submetido à carga, os espaços presentes também podem ser aumentados pelo resultado dos micro-movimentos e afrouxamento do parafuso, resultando na infiltração de micro-organismos e seus fluidos para o interior do implante e vice-versa (Mishra et al., 2017; Asmarz et al., 2021; Shah et al., 2022; Kim et al., 2022). Além disso, a usinagem imprecisa das partes internas do implante e do pilar protético não permite uma área de contato suficiente entre as superfícies para fornecer vedação eficaz e podem contribuir para a ocorrência da micro-infiltração (Do Nascimento et al., 2012; Molinero et al., 2022).

Teixera et al., (2019), encontraram uma porcentagem de infiltração de *S. aureus* em 77% de implantes com conexão cone morse e 100% em conexões do tipo hexágono interno. Estes resultados mostraram que a conexão do tipo cone morse, quando comparada ao hexágono interno, apresentaram maior capacidade de vedação, porém, não foram capazes de impedir a passagem de bactérias e fluidos por meio da interface de conexão (Jaworski et al., 2012; Ardakani et al., 2019; Alriyahi, 2020). A perda de torque pode facilitar a micro-infiltração (Larrucea et al., 2014), e especula-se que esta última possa ainda reduzir os valores de torque (Sahin et al., 2014); Kim et al., 2022). Nossos achados podem se enquadrar nesta conceitualização, uma vez que observamos perda de torque e presença de micro-infiltração bacteriana em todos os grupos. Porém, nosso desenho experimental não permite inferir se a passagem de micro-organismos foi uma consequência da perda de torque entre os componentes, ou mesmo se a perda de torque facilitou a passagem destes micro-organismos.

Estudos da literatura já demonstraram a presença de mais de 700 diferentes espécies de micro-organismos colonizando os tecidos da cavidade oral, incluindo vírus, protozoários, fungos e bactérias que coabitam em homeostase (Deo et al., 2019; Mehrotra et al., 2022). Quando o equilíbrio biológico é rompido, podem ocorrer processos inflamatórios com consequente desenvolvimento de doenças bucais (Garaicoa et al., 2020; Karkowska et al., 2022). Socransky, (1998) classificou os diversos micro-organismos em distintos complexos microbianos, sendo eles: roxo, verde, laranja, amarelo e vermelho, associados de acordo com a virulência bacteriana para a doença periodontal. Os complexos roxo, verde e amarelo

apresentaram fortes associações entre si e foram menos associados aos complexos vermelho e laranja, que apresentam as espécies bacterianas mais estritamente relacionadas às condições de doença (Lee et al., 2017; Berglundh et al., 2019).

Todas as espécies-alvo propostas para serem investigadas neste estudo foram encontradas no interior dos implantes dos diferentes grupos estudados, tanto nas situações envolvendo a aplicação de carga cíclica quanto nos grupos submetidos somente à termociclagem. As espécies *T. denticola*, *T. forshytia* e *P. gingivalis*, que fazem parte do complexo vermelho, e as espécies *S. constellatus*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus*, do complexo laranja, estão diretamente relacionados com a doença periodontal e peri-implantar e foram detectadas em quantidades moderadas no interior dos implantes. Micro-organismos do complexo vermelho quase sempre são encontrados na presença do complexo laranja, pois estes antecedem a colonização por espécies do complexo vermelho (Socransky et al., 1998).

Comparando-se a contagem de micro-organismos do complexo vermelho e laranja no interior dos implantes, o grupo térmico com carga cíclica apresentou os maiores valores de genomas bacterianos. Entretanto, o padrão de distribuição dos genomas nos grupos é semelhante, com os maiores valores sendo observados para o grupo CMC TB e os menores para os grupos CMX U. A condição do carregamento cíclico pode ter provocado micro-movimentos dos componentes durante a carga mecânica que facilitaram a passagem microbiana na interface implante/pilar protético para o interior do implante, assim como foi demonstrado em outros estudos (Do Nascimento et al., 2012; Do Nascimento et al., 2015).

Apesar da menor contagem microbiana, a condição do grupo sem simulação de carga não impediu a infiltração na interface implante/componente protético e conseqüentemente, a colonização no interior do implante. Entre os pilares do grupo estático o grupo CMC TB também apresentou a maior contagem de genomas de bactérias do grupo vermelho (*T. denticola*, *T. forshytia* e *P. gingivalis*), já os micro-organismos pertencentes ao complexo laranja (*S. constellatus*, *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *C. rectus*), o grupo CMX TB apresentou uma contagem de genomas totais superior aos demais grupos, que por sua vez, tiveram uma contagem semelhante. Outros estudos também detectaram a presença de micro-organismos, mesmo em condições com ausência de simulação de carga (Teixeira et al., 2011; Teixeira et al., 2015).

De forma geral, a prevalência das espécies microbianas entre os diferentes pilares se mostrou diferente; o grupo CMC TB teve como espécies mais prevalentes *S. sobrinus*, *T. forshytia*, *T. denticola*, *E. faecalis* e *C. gingivalis*. No grupo CMX TB, as espécies mais encontradas foram *K. pneumoniae*, *L. casei*, *E. corrodens*, *S. oralis* e *S. sobrinus*. Já no grupo

CMX PU, as mais prevalentes foram *C. tropicalis*, *C. Glabrata*, *T. forsythia*, *P. melanogenica* e *S. sobrinus*. No grupo CMX U, prevaleceram as espécies *P. melaninogenica*, *C. rectus*, *C. gingivalis*, *B. fragilis* e *P. nigrescens*. A quantidade de micro-organismos entre os grupos também apresentou diferenças significantes nos valores de contaminação ($p < 0,005$), além dos fatores supracitados que levam ao afrouxamento do parafuso poderem ter contribuído de maneiras distintas entre os grupos para a passagem microbiana para o interior dos implantes, outros fatores como tamanho do micro-organismo, tamanho do *microgap*, topografia de superfície, interações atômicas e energia livre de superfície dos pilares também podem justificar as diferentes quantidades e espécies detectadas entre os grupos (Quirynen et al., 1995; Love et al., 2002; Weart et al., 2007; Cosyn et al., 2011; Passos et al., 2013; Schimitt et al., 2014; Do Nascimento et al., 2015; Hao et al., 2018; De Sousa et al., 2020; Engel et al., 2020). Trabalhos com metodologias semelhantes ao presente estudo, também demonstraram a passagem de micro-organismos do meio externo para o interior dos implantes (Do Nascimento et al., 2008; 2010; Aloise et al., 2010; Teixeira et al., 2011; Do Nascimento et al., 2011).

No geral, espécies periodontopatogênicas pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Tannerella* e *Treponema* foram encontrados em níveis moderados nos grupos de ciclagem térmica e carga cíclica. A presença dessas espécies patogênicas é ameaçadora quando ocorre um desequilíbrio microbiano ou o hospedeiro apresenta suscetibilidade, conforme proposto pela “teoria da placa ecológica”, que apresenta as doenças mediadas por biofilme como resultado de um desequilíbrio na microbiota do hospedeiro (Gehrke et al., 2017; Canullo et al., 2017; Marsh et al., 2017).

Além de bactérias, também foi constatado a presença de alguns fungos no interior dos implantes. A literatura mostra que as espécies *C. topicalis*, *C. albicans*, *C. glabata* e *C. dubliniensis*, identificadas nos grupos estudados, desempenham um papel fundamental, como oportunistas, na constituição do biofilme em associação com bactérias, tendo papel relevante na patogênese da peri-implantite (Baggi et al., 2013; Karkowska et al., 2022). As espécies de fungos mais prevalentes no grupo submetido somente à ciclagem térmica foi a *C. dubliniensis* e no grupo térmico com carga cíclica a *C. glabata*. As espécies de fungos investigadas neste estudo pertencem ao mesmo gênero *Candida* e, portanto, apresentam muitas semelhanças na constituição do material genético, principalmente, no que diz respeito ao tamanho e diâmetro. As diferenças de prevalência encontradas para estas espécies nos diferentes grupos do nosso estudo, assim como as diferenças observadas para as bactérias pertencentes à um mesmo gênero, precisam ser melhor investigadas em estudos futuros. Uma possibilidade, pode ser as

diferenças de potencial eletrostático e interações atômicas que ocorrem entre os diferentes micro-organismos e os substratos.

É importante salientar que detectar micro-organismos no interior dos implantes não é a constatação da doença peri-implantar, mas sim uma situação que pode aumentar substancialmente o risco, uma vez que vários outros fatores são necessários para a instalação da doença, sendo sua etiologia multifatorial (Schwarz et al, 2018; Zandim et al, 2019; Fu et al., 2020).

O método utilizado para investigação da presença de micro-infiltração neste estudo foi a hibridização Checkerboard DNA-DNA Hybridization, que tem sido amplamente utilizado para detectar e quantificar espécies que abrigam diversos sítios da cavidade oral (Shibli et al. 2008; Máximo et al. 2009). Por se tratar de um método baseado na identificação do material genético das espécies-alvo, ele permite detectar espécies viáveis ou não-viáveis dentro de um biofilme. A detecção de espécies não viáveis é um fator muito importante, uma vez que apenas a presença da estrutura celular da bactéria e seus produtos de degradação já representam risco para as estruturas peri-implantares, pois servem de substrato para outras bactérias (Do Nascimento et al., 2011; Lafaurie et al., 2017). Este método tem como principal característica a rapidez e identificação simultânea de várias espécies de micro-organismos. Apesar dos excelentes resultados fornecidos, este método de detecção também apresenta limitações como a sensibilidade reduzida, uma vez que a presença de micro-organismos em concentração inferior a 10^4 células não resulta em sinais detectáveis ou reprodutíveis e detecta apenas espécies que tiveram as sondas preparadas a partir do DNA das espécies definidas como alvos no estudo (Socransky et al., 2004). Desta forma, espécies não-cultiváveis ou que ainda não tiveram o seu genoma determinado não são detectados por este método. Além disso, existe a possibilidade de ligações inespecíficas do reagente de marcação das sondas com outras macromoléculas quando a proporção de DNA é baixa (Socransky et al., 2004). Apesar disso, vários estudos vêm utilizando esta metodologia para comprovar a micro-infiltração de micro-organismos por meio da interface implante-pilar protético (Socransky et al., 2004; Teixeira et al. 2011; Do Nascimento et al., 2012; Gujar et al., 2020).

Os resultados obtidos no presente estudo encontram grande relação com a literatura científica aplicada ao tema. Portanto, pode-se entender que a infiltração microbiana por meio da interface implante-pilar é um problema ainda presente nas reabilitações implantossuportadas, mesmo quando associadas aos implantes de conexões do tipo cone morse; e essa infiltração, se não minimizada ou controlada, pode, em longo prazo, resultar no comprometimento do sucesso clínico do tratamento caso ocorra um desequilíbrio da microbiota oral associada.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pelo desenho experimental proposto, pode-se concluir que:

- 1) O afrouxamento do parafuso do pilar protético e a infiltração de micro-organismos para o interior do implante ocorreu nos 3 tipos de pilares estudados, com ou sem a simulação de carga cíclica.
- 2) Nos grupos com aplicação de carga cíclica, foram observados os maiores valores de perda de torque e de contagem de micro-organismos no interior dos implantes.
- 3) O grupo CMX TB apresentou a menor taxa de afrouxamento, e o grupo CMX U apresentou as menores contagens de micro-organismos provenientes do interior dos implantes.
- 4) As espécies-alvo do estudo apresentaram diferenças significantes de contagens entre os diferentes implantes e tipos de pilares investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alani A, Bishop K. Peri-implantitis. Part 2: Prevention and maintenance of peri-implant health. *British Dental J.*, 2014 Sep 26;217(6), 289-297.
2. Almodalal MA, Morad ML, Hajeer MY, Harfouche M. Comparative Evaluation of Two Different Types of Abutments in Relation to Post-prosthetic Bone Resorption and Periodontal Pocket Depth: A Randomized Controlled Clinical Trial With a One-Year Follow-Up. *Cureus*, 2022 Jun 10;14(6):e25807.
3. Aloise JP, Curcio R, Laporta MZ, Rossi L, Silva AMÁ, Rapoport A. Microbial leakage through the implant–abutment interface of Morse taper implants in vitro. *Clin Oral Implants Res.*, 2010 Mar;21(3):328-35.
4. Alriyahi M. An in vitro assessment of the bacterial sealing capacity of narrow diameter implants with Morse-taper abutment connections. 2020; <http://hdl.handle.net/11394/7332>.
5. Al-Sabbagh M, Shaddox LM. Is peri-implantitis curable?. *Dent Clin North Am.*, 2019 Jul;63(3):547-566.
6. Alsubaiy EF. Abutment screw loosening in implants: A literature review. *J Family Med Prim Care.* 2020 Nov 30;9(11):5490-5494.
7. Al-Thobity, Ahmad M. Titanium Base Abutments in Implant Prosthodontics: A Literature Review. *Eur J Dent.*, 2022 Feb;16(1):49-55.
8. Ardakani MRT, Meimandi M, Amid R, Pourahmadie AD, Shidfar S. In Vitro Comparison of Microbial Leakage of the Implant-Healing Abutment Interface in Four Connection Systems. *J Oral Implantol*, 2019 Oct;45(5):350-355.
9. Asmarz HY, Magrin GL, Prado AM, Passoni BB, Magalhães Benfatti CA. Evaluation of Removal Torque and Internal Surface Alterations in Frictional Morse Taper Connections After Mechanical Loading Associated or Not with Oral Biofilm. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2021 May-Jun;36(3):492-501.
10. Assunção WG, Delben JA, Tabata LF, Barão VAR, Gomes EA, Garcia Jr IR. Preload evaluation of different screws in external hexagon joint. *Implant Dent.*, 2012 Feb;21(1):46-50.
11. Bagegni A, Weihrauch V, Vach K, Kohal R. The Mechanical Behavior of a Screwless Morse Taper Implant-Abutment Connection: An In Vitro Study. *Materials (Basel)*. 2022 May 8;15(9):3381.
12. Baggi L, Di Girolamo M, Mirisola C, Calcaterra R. Microbiological evaluation of bacterial and mycotic seal in implant systems with different implant-abutment interfaces and closing torque values. *Implant Dent.*, 2013 Aug;22(4):344-50.
13. Barbosa Jr SA, Bacchi A, Barão VAR, Silva-Sousa YTC, Bruniera JF, Caldas RA, Consani RLX. Implant volume loss, misfit, screw loosening, and stress in custom titanium and zirconia abutments. *Braz. Dent. J.*, 2020;31(4):374-379.

14. Berbel Seloto C, Strazzi Sahyon HB, Dos Santos PH, Aparecida Delben J, Assunção WG. (2018). Efficacy of Sealing Agents on Preload Maintenance of Screw-Retained Implant-Supported Protheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 January/February;33(1):123–126
15. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM. *et al*. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 2018 Jun;45 Suppl 20:S286-S291.
16. Berglundh T, Jepsen S, Stadlinger B, Terheyden H. Peri-implantitis and its prevention. *Clin Oral Implants Res.*, 2019 Feb;30(2):150-155.
17. Bernardes SR, Mattos MGC, Hobkirk J, Ribeiro RF. Loss of preload in screwed implant joints as a function of time and tightening/untightening sequences. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 2014 Jan-Feb;29(1):89-96.
18. Binon PP. Implants and components: entering the new millennium. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 2000 Jan-Feb;15(1):76-94.
19. Bozkaya D, Mu“ftu“ S. Considerações de eficiência para o ajuste de interferência puramente cônico (TIF) utilizados em implantes dentários. *Diário de Engenharia Biomecânica*, 2004; 4:393-401.
20. Bozkaya D, Mu“ftu“ S. Mecânica do Ajuste de interferência cônico em implantes dentários. *Diário de Biomecânica Biomecânica*, 2003; 36: 1649-1658.
21. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohls-son A. Intra-osseous anchorage of dental protheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.*, 1969;3(2):81-100.
22. Bulaqi HA, Mashhadi MM, Safari H, Samandari MM, Geramipناه F. Dynamic nature of abutment screw retightening: finite element study of the effect of retightening on the settling effect. *J Prosthet Dent.*, 2015 May;113(5):412-9.
23. Bulaqi HA, Mousavi Mashhadi M, Geramipناه F, Safari H, Paknejad M. Efeito do coeficiente de atrito e velocidade de aperto na pré-carga induzida no complexo de implante dentário com o método dos elementos finitos. *J Prosthet Dent.*, 2015;113:405–411
24. Burguete RL, Johns RB, King T, Patterson EA. Tightening characteristics for screwed joints in osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent.*, 1994 Jun;71(6):592-9.
25. Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol*, 1990 Sep;61(9):597-601.
26. Camps-Font O, Rubianes-Porta L, Valmaseda-Castellón E, Jung RE, Gay-Escoda C, Figueiredo R. Comparison of external, internal flat-to-flat, and conical implant abutment connections for implant-supported protheses: A systematic review and network meta-analysis of randomized clinical trials. *J Prosthetic Dentistry*, 2021 Nov 12;1-14.

27. Canullo L, Radovanović S, Delibasic B, Blaya JA, Penarrocha D, Rakic M. The predictive value of microbiological findings on teeth, internal and external implant portions in clinical decision making. *Clin Oral Implants Res.*, 2017 May;28(5):512-519.
28. Cardoso M, Balducci I, Telles DDM, Lourenço EJV, Nogueira Júnior L. (2016). Edentulismo no Brasil: tendências, projeções e expectativas até 2040. *Ciênc. Saúde Colet. (Impr.)*, 2016 Abr; 21(4): 1239-1246.
29. Caricasulo R, Malchiodi L, Ghensi P, Fantozzi G, Cucchi A. The influence of implant-abutment connection to peri-implant bone loss: A systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 2018 Aug;20(4):653-664.
30. Carinci F, Romanos GE, Scapoli L. Molecular tools for preventing and improving diagnosis of peri-implant diseases. *Periodontol 2000.* 2019 Oct;81(1):41-47.
31. Carvalho R, Botelho J, Machado V, Mascarenhas P, Alcoforado G, Mendes JJ, Chambrone L. Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: An updated systematic review. *J Clin Periodontol.*, 2021 Aug;48(8):1019-1036.
32. Chapman RJ, Grippo W. O bloqueio conexão cônica para pilares de implantes: uso e confiabilidade. *Implantodontia*, 1996; 4: 257–261.
33. Cho YD, Kim PJ, Kim HG, Seol YJ, Lee YM, Ryoo HM, Ku Y. Transcriptome and methylome analysis of periodontitis and peri-implantitis with tobacco use. *Gene.* 2020 Feb 15;727:144258.
34. Comuzzi L, Tumedei M, Pontes A E, Piattelli A, Iezzi G. Primary stability of dental implants in low-density (10 and 20 pcf) polyurethane foam blocks: conical vs cylindrical implants. *Int J Environ Res Public Health*, 2020 Apr 11;17(8):2617.
35. Cosyn J, Eghbali A, Bruyn H, Collys K, Cleymaet R, Rouck T. Immediate single-tooth implants in the anterior maxilla: 3-year results of a case series on hard and soft tissue response and aesthetics. *J Clin Periodontol*, 2011 Aug;38(8):746-53.
36. da Silva-Neto JP, Prudente MS, Dantas TS, Senna PM, Ribeiro RF, Neves FD. Microleakage at different implant-abutment connections under unloaded and loaded conditions. *Implant Dent.* 2017 Jun;26(3):388-392.
37. De Mello JS, Faot F, Correa G, Júnior OC. Success rate and complications associated with dental implants in the incisive canal region: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Dec;46(12):1584-1591.
38. De Oliveira LF, de Góes LF. Article Title. ID on line. *Revista de Psicologia*, 2018;12(42), 1110-1118.
39. De Sousa CA, Taborda MBB, Momesso GAC, Rocha EP, Santos PH, Santiago-Júnior JF, Assunção WG. Materials sealing preventing biofilm formation in implant/abutment joints: which is the most effective? A systematic review and meta-analysis. *J Oral Implantol*, 2020 Apr 1;46(2):163-171.

40. Degidi M, Daprile G, Piattelli A, Carinci F. Evaluation of factors influencing resonance frequency analysis values, at insertion surgery, of implants placed in sinus-augmented and nongrafted sites. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Sep;9(3):144-9.
41. Delben JA, Gomes EA, Barão VA, Assunção WG. Evaluation of the effect of retightening and mechanical cycling on preload maintenance of retention screws. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2011 Mar-Apr;26(2):251-6.
42. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.*, 2019 Jan-Apr;23(1):122-128.
43. Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. Avaliação in vitro do selo implante-pilar: o sistema de travamento cônico. *International J Oral & Maxillofacial Implants*, 20: 732-737.
44. Dixon DR, London RM. Restorative design and associated risks for peri-implant diseases. *Periodontology*, 2000; 81(1):167-178.
45. Dixon DR, London RM. Restorative design and associated risks for peri-implant diseases. *Periodontology*, 2000;81(1):167-178.
46. Do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Gonçalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, Macedo AP, de Albuquerque RF Jr. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2012 May-Jun;27(3):551-60.
47. Do Nascimento C, Paulo DF, Pita MS, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF. Microbial diversity of the supra-and subgingival biofilm of healthy individuals after brushing with chlorhexidine-or silver-coated toothbrush bristles. *Canadian J Microbiology*, 2014; 61(2):112-123.
48. Do Nascimento C, Pita MS, Santos ES, Monesi N, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent Mater.*, 2016 Jan;32(1):93-101.
49. Douglass CW, Shih A, Ostry L. Will there be a need for complete dentures in the United States in 2020?. *J Prosthet Dent*. 2002 Jan;87(1):5-8.
50. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990;12(1):13-15.
51. Drago CJ, Lazzara RJ. Immediate Occlusal Loading of Osseotite® Implants in Mandibular Edentulous Patients: A Prospective Observational Report with 18-Month Data. *J Prosthodont.*, 2006 May-Jun;15(3):187-94.
52. DuVall NB, DeReis SP, Vandewalle KS. Fracture strength of various titanium-based, CAD-CAM and PFM implant crowns. *J Esthet Restor Dent.*, 2021 Apr;33(3):522-530.
53. Ellakany P, Mahrous AA, Al Eraky DM, Albarrak A, AlJindan R, Fouda SM. Evaluation of Bacterial Leakage in Platform-Switching Dental Implant with Morse Taper Connection Under Thermocycling and Loading Effects: In Vitro Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2021 Jan-Feb;36(1):68-74.

54. Engel AS, Kranz HT, Schneider M, Tietze JP, Piwowarczyk A, Kuzius T, Arnold W, Naumova E. A. Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*, 2020 Jun 3;20(1):162.
55. Feitosa PCP, Lima APB, Brandt WC, Neves ACC. Stability of external and internal implant connections after a fatigue test. *Eur J Dent.*, 2013 Jul-Sep; 7(3): 267–271.
56. Fu JH, Wang HL. Breaking the wave of peri-implantitis. *Periodontol*, 2000. 2020 Oct;84(1):145-160.
57. Fu JH, Wang HL. Breaking the wave of peri-implantitis. *Periodontology*, 2000;84(1):145-160.
58. Garaicoa JL, Bates AM, Avila-Ortiz G, Brogden KA. Antimicrobial Prosthetic Surfaces in the Oral Cavity-A Perspective on Creative Approaches. *Microorganisms*, 2020 Aug 17;8(8):1247.
59. Gehrke SA, Dedavid BA, de Oliveira Fernandes GV. A new design of a multifunctional abutment to morse taper implant connection: Experimental mechanical analysis. *J Mech Behav Biomed Mater.*, 2021 Apr;116:104347.
60. Gehrke SA, Delgado-Ruiz RA, Prados Frutos JC, Prados-Privado M, Dedavid BA, Granero Marín JM, Calvo Guirado JL. Misfit of Three Different Implant-Abutment Connections Before and After Cyclic Load Application: An In Vitro Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2017 Jul/Aug;32(4):822-829.
61. Gehrke SA, Pérez-Albacete Martínez C, Piattelli A, Shibli JA, Markovic A, Calvo Guirado JL. The influence of three different apical implant designs at stability and osseointegration process: experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.*, 2017 Mar;28(3):355-361.
62. Gu Y, Bai Y, Xie X. Bite Force Transducers and Measurement Devices. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021 Apr 9;9:665081.
63. Gujar AN, Al-Hazmi A, Raj AT, Patil S. Microbial profile in different orthodontic appliances by checkerboard DNA-DNA hybridization: An in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 2020 Jan;157(1):49-58.
64. Hao Y, Huang X, Zhou X. *et al.* Influence of dental prosthesis and restorative materials interface on oral biofilms. *Int J Mol Sci.*, 2018 Oct; 19(10): 3157.
65. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol*, 2008 Sep;35(8 Suppl):292-304.
66. Hussain RA, Miloro M, Cohen JB. An Update on the Treatment of Periimplantitis. *Dent Clin North Am.*, 2021 Jan;65(1):43-56.
67. Javed F, Almas K, Crespi R, Romanos GE. Implant surface morphology and primary stability: is there a connection?. *Implant Dent.*, 2011 Feb;20(1):40-6.

68. Jaworski ME, Melo ACM, Picheth CMT, Sartori IADM. Analysis of the bacterial seal at the implant-abutment interface in external-hexagon and Morse taper-connection implants: an in vitro study using a new methodology. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2012 Sep-Oct;27(5):1091-5.
69. Jorge JRP, Barao VAR, Delben JA, Assuncao WG. The role of implant/abutment system on torque maintenance of retention screws and vertical misfit of implant-supported crowns before and after mechanical cycling. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2013 Mar-Apr;28(2):415-22.
70. Jörn D, Kohorst P, Besdo S, Rucker M, Stiesch M, Borchers L. Influence of lubricant on screw preload and stresses in a finite element model for a dental implant. *J Prosthet Dent.*, 2014 Aug;112(2):340-8.
71. Jörn L, Jemt T, Carlsson L. Loads and designs of screw joints for single crowns supported by osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1992 Fall;7(3):353-359.
72. Júnior RDCF, de Oliveira WLÁ, Vieira PGM, Magalhães SR. Implantodontia: Próteses totais fixas sobre implante com carga imediata em mandíbula. *Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde*, 2014 July 4; 4(1):76-93.
73. Kano SC, Binon P, Bonfante G, Curtis DA. Effect of casting procedures on screw loosening in UCLA-type abutments. *J Prosthodont*, 2006 Mar-Apr;15(2):77-81.
74. Karkowska-Kuleta J, Satala D, Smolarz M, Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Fungi—A Component of the Oral Microbiome Involved in Periodontal Diseases. *Adv Exp Med Biol.*, 2022;1373:113-138.
75. Karkowska-Kuleta J, Satala D, Smolarz M, Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Fungi-A Component of the Oral Microbiome Involved in Periodontal Diseases. *Adv Exp Med Biol.*, 2022;1373:113-138.
76. Karl M, Taylor TD. Effect of Cyclic Loading on Micromotion at the Implant-Abutment Interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2016 Nov-Dec;31(6):1292-7.
77. Karoussis IK, Brägger U, Salvi GE, Bürgin W, Lang NP. Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI® Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.*, 2004 Feb;15(1):8-17.
78. Kensara A, Hefni E, Williams MA, Saito H, Mongodin E, Masri R. Microbiological Profile and Human Immune Response Associated with Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Prosthodont*, 2021 Mar;30(3):210-234.
79. Khraisat A, Stegaroiu R, Nomura S, Miyakawa O. Fatigue resistance of two implant/abutment joint designs. *J Prosthet Dent.*, 2002 Dec;88(6):604-10.
80. Kim S, Lee JW, Kim JH, Truong VM, Park YS. The impact of Morse taper implant design on microleakage at implant-healing abutment interface. *Dent Mater J.*, 2022 Oct 2;41(5):767-773.

81. Kim YK, Kim SG, Oh HK, Choi YG, Cho YS, Oh YH, Ong JL. Evaluation of peri-implant tissue in nonsubmerged dental implants: a multicenter retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2009 Aug;108(2):189-95.
82. Kim YK, Park JY, Kim SG, Lee HJ. Prognosis of the implants replaced after removal of failed dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2010 Sep;110(3):281-6.
83. Klinge B, Klinge A, Bertl K, Stavropoulos A. Peri-implant diseases. *Eur J Oral Sci.*, 2018; 126(Suppl. 1):88–94.
84. Lafaurie GI, Sabogal MA, Castillo DM, Rincón MV, Gómez LA, Lesmes YA, Chambrone L. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review *J Periodontol*, 2017 Oct;88(10):1066-1089.
85. Lages FS, Douglas-de Oliveira DW, Costa FO. Relationship between implant stability measurements obtained by insertion torque and resonance frequency analysis: A systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 2018 Feb;20(1):26-33.
86. Larrucea C, Conrado A, Olivares D, Padilla C, Barrera A, Lobos O. Bacterial microleakage at the abutment-implant interface, in vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 2018 Jun;20(3):360-367.
87. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.*, 2017 Jul;62:1-12.
88. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.*, 2017 Jul;62:1-12.
89. Lemos CAA, Verri FR, Noritomi PY, Kemmoku DT, Batista VES, Cruz RS, Gomes JML, Pellizzer EP. Effect of bone quality and bone loss level around internal and external connection implants: A finite element analysis study. *J Prosthet Dent.*, 2021 Jan;125(1):137.e1-137.e10.
90. Leocádio ACS, Silva Junior M, Oliveira JPL, Pinto GC, Faeda RS, Padovan LEM, Marcantonio Junior E. Evaluation of Implants with Different Macrostructures in Type I Bone—Pre-Clinical Study in Rabbits. *Materials (Basel)*, 2020 Apr; 13(7): 1521.
91. Liu Y, Wang J. Influences of microgap and micromotion of implant–abutment interface on marginal bone loss around implant neck. *Arch Oral Biol.*, 2017 Nov;83:153-160
92. Londhe SM, Gowda EM, Mandlik VB, Shashidhar MP. Factors associated with abutment screw loosening in single implant supported crowns: A cross-sectional study. *Med J Armed Forces India*, 2020 Jan;76(1):37-40.
93. Lopes AC, Rezende CEE, Fernandes MDS, Weinfeld I. Bacterial leakage of the implant-abutment interface: what the implantologist should know. *RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)*, 2010;58(2), 239-242.
94. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 2002;13(2):171-83.

95. Macedo JP, Pereira J, Vahey BR, Henriques B, Benfatti CA, Magini RS, Souza JC. Morse taper dental implants and platform switching: The new paradigm in oral implantology. *Eur J Dent.*, 2016 Jan-Mar;10(1):148-154.
96. Malchiodi L, Quaranta A, D'Addona A, Scarano A, Quaranta M. Jaw reconstruction with grafted autologous bone: early insertion of osseointegrated implants and early prosthetic loading *J Oral Maxillofac Surg.*, 2006; 64(8), 1190-1198.
97. Mark AM. Preventing tooth loss. *J Am Dent Assoc.*, 2020 Sep;151(9):712.
98. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.*, 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S2.
99. Martin WC, Woody RD, Miller BH, Miller AW. Implant abutment screw rotations and preloads for four different screw materials and surfaces. *J Prosthet Dent.*, 2001 Jul;86(1):24-32.
100. Maximo MB, De Mendonça AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Jan;20(1):99-108.
101. McGlumphy EA, Mendel DA, Holloway JA. Implant screw mechanics. *Dent Clin North Am.*, 1998 Jan;42(1):71-89.
102. Mehrotra N, Singh S. Periodontitis. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
103. Mendonça G, Mendonça DBS, Fernandes-Neto AJ, Neves FD. Management of fractured dental implants: a case report. *Implant Dent.*, 2009 Feb;18(1):10-6.
104. Meyer S, Giannopoulou C, Cancela J, Courvoisier D, Müller F, Mombelli A. Experimental mucositis/gingivitis in persons aged 70 or over: microbiological findings and prediction of clinical outcome. *Clin Oral Investig.*, 2019 Oct;23(10):3855-3863.
105. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the different implant abutment interface: a systematic review. *J Clin Diagn Res.*, 2017 Jun;11(6):ZE10–ZE15. ZE10.
106. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the Different Implant Abutment Interface: A Systematic Review. *J Clin Diagn Res.*, 2017 Jun;11(6):ZE10-ZE15.
107. Missika P, Bessade J. Implants dentaires [Dental implants]. *Rev Prat.*, 2018 Oct;68(8):827-830. French. PMID: 30869444.
108. Möhlhenrich SC, Kniha K, Heussen N, Hölzle F, Modabber A. Effects on primary stability of three different techniques for implant site preparation in synthetic bone models of different densities. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 2016 Nov;54(9):980-986.
109. Molinero-Mourelle P, Roccuzzo A, Yilmaz B, Lam WYH, Pow EHN, Highsmith JDR, Gómez-Polo M. Microleakage assessment of CAD-CAM Cobalt-Chrome and Zirconia abutments on a conical connection dental implant: A comparative in vitro study. *Clin Oral Implants Res.*, 2022 Sep;33(9):945-952.

110. Moreno ALM, Dos Santos DM, Bertoz APM, Goiato MC. Abutment on Titanium-Base Hybrid Implant: A Literature Review. *Eur J Dent.* 2022 Oct 11. doi: 10.1055/s-0042-1750801. Online ahead of print. PMID: 36220125.
111. Morneburg TR, Pröschel PA. Measurement of masticatory forces and implant loads: a methodologic clinical study. *Int J Prosthodont.*, 2002 Jan-Feb;15(1):20-7.
112. Mu ftu Chapman, RJ. Substituição de dentes posteriores por implantes independentes: quatro anos resultados protéticos de um estudo prospectivo. *J American Dental Association*, 1998; 8: 1097-1102.
113. Nogueira MCF, Bacchi A, Santos MBF, Mesquita MF, Consani RLX. Effects of platform switching in implant-supported rehabilitations– a literature review. *RFO UPF [online]*, 2012 Jan./Abr;17(1):113-119.
114. Oliveira MCD, Corrêa DFM, Laurêdo LFB, Mendonça LPD, Lemos ABD, Carmo GGWD. Peri-implantite: etiologia e tratamento. *Rev. Bras. Odontol.*, 2015 Jan./Jun;72(1-2), 96-99.
115. O'Mahony A, MacNeill SR, Cobb CM. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. *Quintessence Int.*, 2000 Apr;31(4):249-56.
116. Oue H, Doi K, Oki Y, Makihara Y, Kubo T, Perrotti V, Tsuga K. Influence of implant surface topography on primary stability in a standardized osteoporosis rabbit model study. *J Funct Biomater*, 2015 Mar 18;6(1):143-52.
117. Pardal-Peláez B, Montero J. Preload loss of abutment screws after dynamic fatigue in single implant-supported restorations. A systematic review. *J Clin Exp Dent.*, 2017 Nov 1;9(11):e1355-e1361.
118. Park JK, Choi JU, Jeon YC, Choi KS, Jeong CM. Effects of abutment screw coating on implant preload. *J Prosthodont.*, 2010 Aug;19(6):458-64.
119. Passos SP, May LG, Faria R, Özcan M, Bottino MA. Implant–abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2013 Oct;101(7):1321-8.
120. Pérez-Chaparro PJ, Duarte PM, Shibli JA, Montenegro S, Lacerda HS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. The Current Weight of Referências| 134 Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol.*, 2016 Nov; 87(11):1295-1304.
121. Peruzetto WM, Martinez EF, Peruzzo DC, Joly JC, Napimoga MH. Microbiological seal of two types of tapered implant connections. *Braz. Dent. J.*, 2016 May-Jun;27(3):273-277.
122. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec;5(4):254-9.

123. Quek CE, Tan KB, Nicholls JI. Load fatigue performance of a single-tooth implant abutment system: effect of diameter. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006 Nov-Dec;21(6):929-36.
124. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.*, 1995 Jan;22(1):1-14.
125. Rakic M, Grusovin MG, Canullo L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2016 Mar-Apr;31(2):359-68.
126. Rani S, Devi J, Verma M. Implant success lies in complications management: A report of two cases. *Contemp Clin Dent*. 2016 Apr-Jun;7(2):226-8.
127. Rocha Bernardes S, Chiarello de Mattos M da G, Hobkirk J, Faria Ribeiro R. Perda de pré-carga em articulações de implantes aparafusados em função do tempo e sequências de aperto desaperto. *Implantes Maxilofac Orais Int J*. 2014;29:89-96
128. Sahin C, Ayyildiz S. Correlation between microleakage and screw loosening at implant-abutment connection. *J Adv Prosthodont.*, 2014 Feb;6(1):35-8.
129. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res.*, 2005 Jun;40(3):277-85.
130. Satala D, Gonzalez-Gonzalez M, Smolarz M, Surowiec M, Kulig K, Wronowska E, Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M, Karkowska-Kuleta J. The Role of *Candida albicans* Virulence Factors in the Formation of Multispecies Biofilms With Bacterial Periodontal Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2022 Jan 5;11:765942.
131. Schmitt CM, Nogueira-Filho G, Tenenbaum HC, Lai JY, Brito C, Doering H, Nonhoff J. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. *J Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2013;102(2), 552-574.
132. Schmitt CM, Nogueira-Filho G, Tenenbaum HC, Lai JY, Brito C, Doering H, Nonhoff J. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. *J Biomed Mater Res A.*, 2014 Feb;102(2):552-74.
133. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol.*, 2018 Jun;89 Suppl 1:S267-S290.
134. Seloto CB, Strazzi-Sahyon HB, Dos Santos PH, Assunção WG. Efficacy of Sealing Agents on Preload Maintenance of Screw-Retained Implant-Supported Protheses. *J Prosthodont Res.*, 2021 Oct 15;65(4):489-494.
135. Shah KK, Sivaswamy V. A Literature Review on Implant Abutment Types, Materials, and Fabrication Processes. *J Long Term Eff Med Implants.*, 2022;33(1):57-66.

136. Shibata Y, Tanimoto Y, Maruyama N, Nagakura M. A review of improved fixation methods for dental implants. Part II: biomechanical integrity at bone-implant interface. *J Prosthodont Res.*, 2015; 59(2):84-95.
137. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. (2008). Composition of supra-and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct;19(10):975-82.
138. Siamos G, Winkler S, Boberick KG. The relationship between implant preload and screw loosening on implant-supported prostheses. *J Oral Implantology*, 2002 Mar 31;28(2), 67-73.
139. Silva AS, Mendes JM, Araújo T, Aroso C, Barreiros P. Comparison of Mechanical Resistance to Maximal Torsion Stress in Original and Nonoriginal or Compatible Prosthetic Implant Screws: An In Vitro Study. *Int J Dent.*, 2021 Dec 2;2021:5133556.
140. Silva ETD, Oliveira RTD, Leles CR. O edentulismo no Brasil: epidemiologia, rede assistencial e produção de próteses pelo Sistema Único de Saúde. *BSB - Artigos de Periódicos*, 2015. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/41096>.
141. Silva-Neto JP, Prudente MS, Dantas TS, Senna PM, Ribeiro RF, Neves FD. Microleakage at different implant-abutment connections under unloaded and loaded conditions. *Implant Dent.* 2017 Jun;26(3):388-392.
142. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*, 2004 Dec;19(6):352-62.
143. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, 1994 Oct 01;17(4):788-792.
144. Srinivasan M, Meyer S, Mombelli A, Müller F. (2017). Dental implants in the elderly population: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.*, 2017 Aug;28(8):920-930.
145. Steffens JP, Marcantonio RAC. Classification of Periodontal and Periimplantar Diseases and Conditions: a Practical Guide and Key Points. *Rev. Odontol. UNESP (Online)*, 2018 jul.-ago; 47(4): 189-197.
146. Taborda MBB, Gonçalves GSY, Sousa CA, Assunção, WG. Analysis of Torque Maintenance and Fracture Resistance after Fatigue in Retention Screws Made of Different Metals for Screw-Retained Implant-Borne Prosthesis Joints. *Int J Dent.*, 2021 Nov 18;2021:9693239.
147. Tan KB, Nicholls JI. Implant-abutment screw joint preload of 7 hex-top abutment systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2001 May-Jun;16(3):367-77.
148. Teixeira LEM, Soares GG, Teixeira HC, Takenaka IKTM, Diniz SOF, Andrade MAP, Araújo ID. Efficacy of ^{99m}Tc-labeled ceftizoxime in the diagnosis of subclinical infections associated with titanium implants in rats. *Surg Infect (Larchmt)*, 2015 Jun;16(3):352-7.

149. Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):56-62.
150. Teixeira, W. Avaliação in vitro da infiltração bacteriana na interface implante/componente protético após aplicação de gel contendo metronidazol, em conexões do tipo Cone Morse [Doctoral dissertation], Universidade de São Paulo, 2019.
151. Tsuruta K, Ayukawa Y, Matsuzaki T, Kihara M, Koyano K. The influence of implant–abutment connection on the screw loosening and microleakage. *Int J Implant Dent*. 2018 Apr 9;4(1):11.
152. Tumedei M, Savadori P, Del Fabbro M. Synthetic blocks for bone regeneration: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 28;20(17):4221.
153. Varise C, Abi RF, Messias AM, Neves FD, Segalla JC, Reis JM. Sistema Cone Morse e utilização de pilares com plataforma switching. *Rev. Bras. Odontol*. 2015; 72(1-2): 56-61.
154. Vélez J, Peláez J, López-Suárez C, Agustín-Panadero R, Tobar C, Suárez MJ. Influence of implant connection, abutment design and screw insertion torque on implant-abutment misfit. *J Clin Med*. 2020 Jul 24;9(8):2365.
155. Vélez J, Peláez J, López-Suárez C. et al. Influence of implant connection, abutment design and screw insertion torque on implant-abutment misfit. *J Clin Med*. 2020 Jul 24;9(8):2365.
156. Vetromilla BM, Brondani LP, Pereira-Cenci T, Bergoli CD. (2019). 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*. 2019 Mar;121(3):398-403.e3.
157. Vinhas AS, Aroso C, Salazar F, López-Jarana P, Ríos-Santos JV, Herrero-Climent M. Review of the mechanical behavior of different implant–abutment connections. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 23;17(22):8685.
158. Weart RB, Lee AH, Chien AC, Haeusser DP, Hill NS, Levin PA. A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell*. 2007 Jul 27;130(2):335-47.
159. Wittneben JG, Buser D, Salvi GE, Bürgin W, Hicklin S, Brägger U. Complication and failure rates with implant-supported fixed dental prostheses and single crowns: A 10-year retrospective study. *Clin Implant Dentistry Related Research*, 2014 Jun; 16(3), 356-364.
160. Yu Z, Feng Y, Kong H, Xiao Y, Li, Y, Wang J, Li DH. Establishment of animal model of bacterial microleakage at implant-abutment interface. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2020 May 9;55(5):337-342.
161. Zandim-Barcelos DL, Carvalho GGD, Sapata VM, Villar CC, Hämmerle C, Romito GA. Implant-based factor as possible risk for peri-implantitis. *Braz. Oral Res*. 2019 Sep 30; 33(suppl):e067.

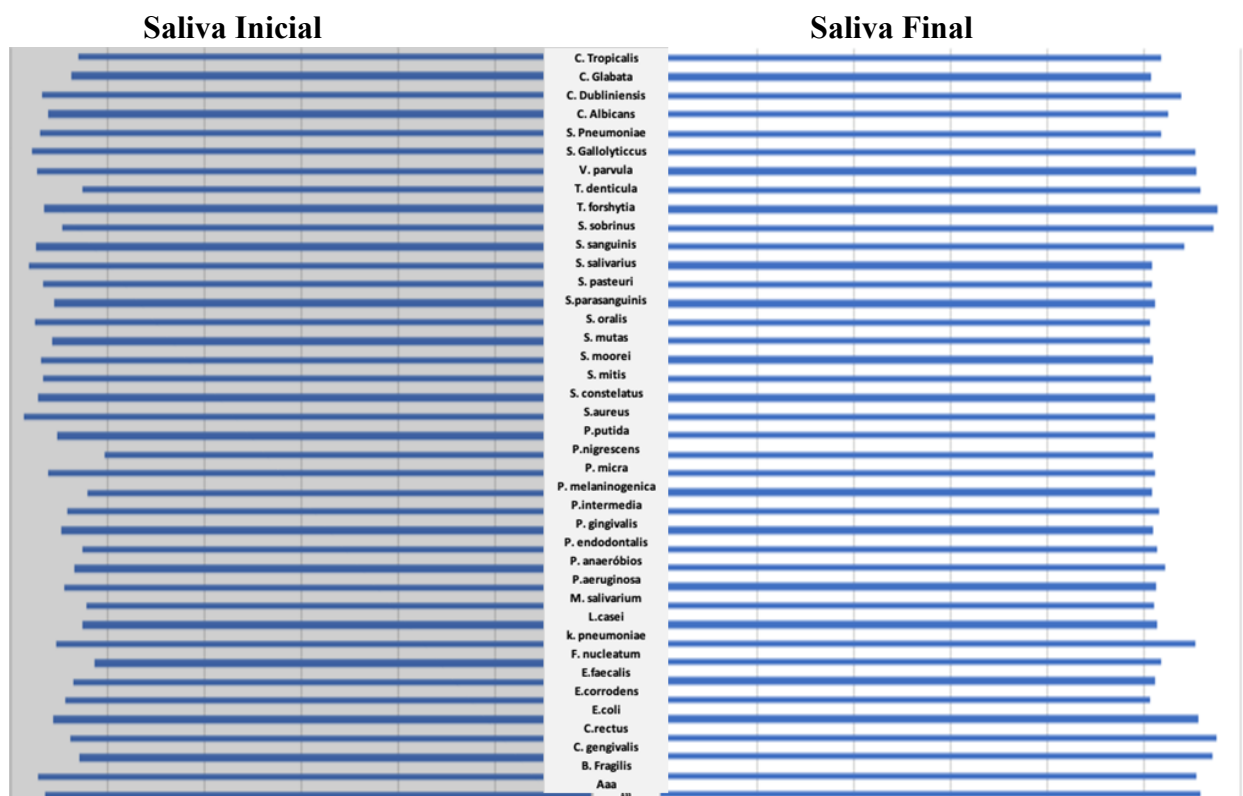
162. Zhou T, Mirchandani B, Li XX, Mekcha P, Buranawat B. Quantitative parameters of digital occlusal analysis in dental implant supported restorative reconstruction recent 5 years: a systematic review. *Acta Odontol Scand.*, 2022 May 26;1-17.

ANEXOS

ANEXO 1 - CONTAGEM MICROBIOLÓGICA DA SALIVA

As amostras apresentaram diferenças significantes em relação à contagem de microrganismos ($p < 0,0001$), mas não apresentaram diferenças em relação à incidência das espécies ($p > 0,05$ – figura).

Figura 32 - Ilustração gráfica da contagem de microrganismos ($\times 10^5$) detectados na saliva dos doadores antes e após o ensaio de ciclagem de carga.



Fonte: Mata (2022)

Figura 33 – Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil da quantificação de genomas totais das 40 espécies-alvo identificadas na saliva inicial e final.

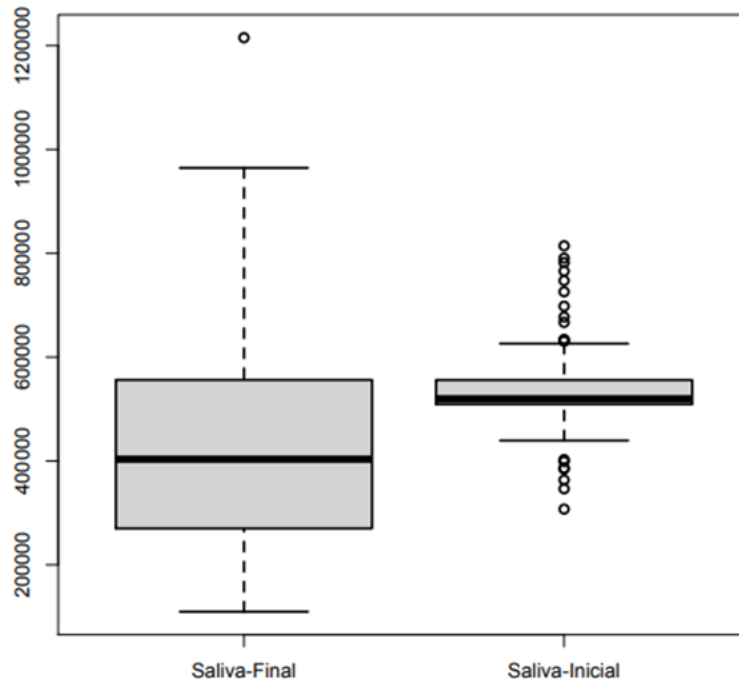
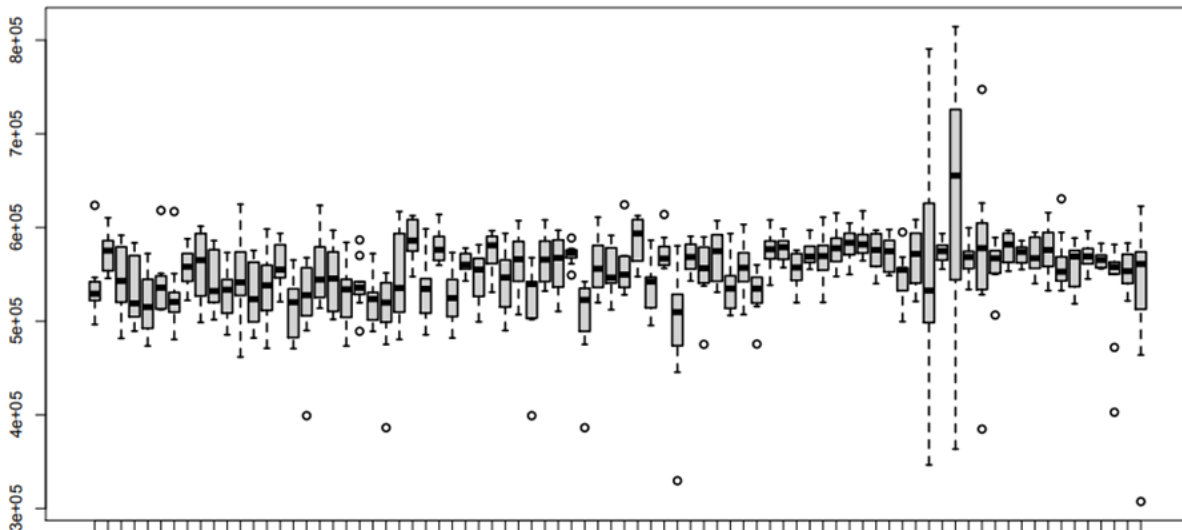
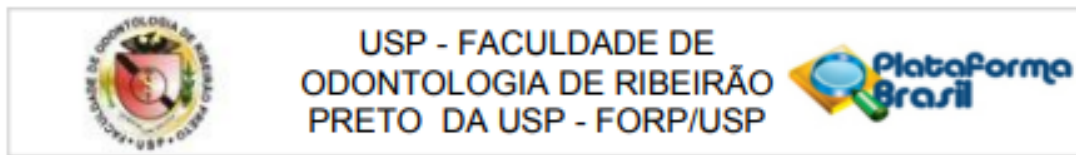


Figura 34 – Representação dos valores das medianas, valores máximos e mínimos, e intervalo interquartil da quantificação de genomas totais das 40 espécies-alvo identificadas na saliva.



Fonte: Mata (2022)

ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Estudo de diferentes conexões internas implante/pilar protético: transmissão de tensões e capacidade de vedamento bacteriano sob condições estáticas e pós carregamento termomecânico.

Pesquisador: ANSELMO AGOSTINHO SIMIONATO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25836819.2.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.968.932

Apresentação do Projeto:

Envio de Emenda, solicitando a inclusão de novos pesquisadores e prorrogação de prazo por 12 meses para a entrega do relatório final do projeto. Os pesquisadores informaram que devido à Pandemia do Covid-19 houve paralisação das atividades laboratoriais e clínicas, o que inviabilizou as atividades previstas para o projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Envio de Emenda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente no projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pedido de emenda foi feito através de formulário específico, devidamente preenchido.

Os pesquisadores Adriana Cláudia Faria Lapria Queiroz, Victor Barboza da Mata e Daniel Zuluaga Goyeneche, foram incluídos no projeto da Plataforma Brasil e o cronograma foi atualizado.

APÊNDICE

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Estudo de diferentes conexões internas implante/pilar protético: transmissão de tensões e capacidade de vedamento bacteriano sob condições estáticas e pós carregamento termomecânico”, **Pesquisador(es):** Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro, Profa. Dra. Renata Cristina Silveira Rodrigues, Prof. Dr. Cássio do Nascimento, Anselmo Agostinho Simionato, Victor Barboza da Mata e Daniel Zuluaga.

Responsável: Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro

Você está sendo convidado a participar da nossa pesquisa sobre a contaminação bacteriana em implantes dentários. Esta pesquisa tem como objetivo verificar o vedamento bacteriano entre implante dentário e pilar protético. O estudo será realizado com análises laboratoriais de amostras de placa bacteriana formada sobre os diferentes tipos de implantes odontológicos.

Para a pesquisa, o participante será convidado a doar um pequeno volume de saliva (5 mL – que representam aproximadamente uma colher de chá). A coleta do material tem uma duração prevista de 5 minutos, e você receberá instruções do pesquisador de como deverá ser feita a doação da saliva (cuspir pequenas quantidades em um recipiente). A sua saliva será utilizada como meio de contaminação dos implantes que serão estudados, simulando o que acontece na boca do paciente. A saliva será utilizada exclusivamente para o desenvolvimento desta pesquisa em laboratório. A coleta da saliva será realizada no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular, localizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, Bloco D, sala 113, permanecendo no biorrepositório do laboratório até o final dos testes, quando será jogada fora.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, mas terá a garantia de ressarcimento e/ou indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Você somente doará a saliva e sua participação não causará qualquer risco a sua saúde. O único desconforto possível após a participação pode ser a sensação de “boca seca” ou sede após a doação de saliva. Como benefício à sua participação nesta pesquisa será oferecido uma instrução de higiene oral. Além disso, os resultados desta pesquisa poderão contribuir para reduzir os problemas inflamatórios relacionados aos tratamentos com implantes. Os resultados obtidos serão divulgados em revistas científicas e/ou apresentados em congressos. Será garantido o sigilo de seus dados pessoais e sua identidade não será divulgada.

Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades. Sua negativa em participar não prejudicará sua relação com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto ou com os pesquisadores envolvidos. Você terá o acompanhamento dos responsáveis pela pesquisa e caso surja alguma dúvida sobre as análises ou sobre os objetivos do estudo, poderá procurá-los a qualquer momento. Quaisquer esclarecimentos antes, durante e após, podem ser obtidos conversando com o(s) pesquisador(es) Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro e Prof. Dr. Cássio do Nascimento pelos telefones (16) 3315-4046 e (16) 3315-4152, ou pelos emails **rribeiro@forp.usp.br** ou **cassionasc@forp.usp.br**.

Você poderá também obter informações diretamente no **Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da FORP-USP** no seguinte endereço: **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Av. Do Café s/nº, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP. Email: cep@forp.usp.br Tel. (16) 3315-0493, das 13h as 17h, de segunda a sexta-feira (exceto feriados e pontos facultativos).**

Você assinará este documento em duas vias sendo que uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável.

Assinatura do Participante

RG: _____

CPF: _____

Tel.: _____

Email: _____

Pesquisador Responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.