

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Sabino Haroldo Ferrari Jr

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PROHEAL® NA
CONTAMINAÇÃO DA INTERFACE PILAR-IMPLANTE POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

São Paulo

2019

Sabino Haroldo Ferrari Jr

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PROHEAL® NA
CONTAMINAÇÃO DA INTERFACE PILAR-IMPLANTE POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Odontologia da Universidade
Santo Amaro – UNISA, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Pallos
Co-Orientadora: Profa. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo

2019

F427a Ferrari Junior, Sabino Haroldo

Avaliação da atividade antimicrobiana do proheal® na contaminação da interface pilar-implante por *porphyromonas gingivalis* / Sabino Haroldo Ferrari Junior. – São Paulo, 2019.

51 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Santo Amaro, 2019.

Orientador(a): Profª. Dra. Debora Pallos

Co-orientador(a): Profª. Dra. Yeon Jung Kim

1. Clorexidina. 2. Iodofórmio. 3. *Porphyromonas gingivalis*. 4. Implantes dentários. I. Pallos, Débora, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Sabino Haroldo Ferrari Jr

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PROHEAL® NA
CONTAMINAÇÃO DA INTERFACE PILAR-IMPLANTE POR
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

São Paulo, ____ de _____ de 2019.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Debora Pallos (orientadora)

Instituição: UNISA Julgamento: _____

Prof.^a Dr.^a Yeon Jung Kim

Instituição: UNISA Julgamento: _____

Prof.^a Dr.^a Karina Cogo Muller

Instituição: UNICAMP Julgamento: _____

Conceito Final: _____

*Dedico este trabalho a minha mulher, Viviane, e a minha filha, Gabriella.
Amores de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, gracias a la vida.

Aos meus pais, Sabino e Catharina. Em especial, agradeço a minha mãe, Catharina, pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida reta, corajosa e de dedicação à família.

A minha mulher e companheira, Viviane, pelo apoio, paciência, estímulo e compreensão nesses anos todos. Amor da minha vida!

A minha filha, Gabriella, por tornar minha vida mais bela a cada despertar e me fazer lutar por um amanhã melhor. Amor da minha vida!

Aos meus irmãos e familiares, que acompanharam e apoiaram essa minha jornada.
Aos meus sogros, Oscar e Carmen, pelo companheirismo e ajuda sempre que foi necessária.

A Cláudia Pangoni e Renato Ferrari, que me acolheram em sua casa durante esse período.

Aos meus Caríssimos Amigos, presença constante e fundamental em minha vida.
Ao Fabricio Pereira Cruz, responsável pela tarefa de realizar a minha inclusão digital.
Aos queridos mestres do corpo docente do programa de Mestrado em Odontologia da Unisa, Professores Doutores Angélica Castro Pimentel, Caio Vinicius Gonçalves Roman- Torres, Fabiana Martins e Martins de Oliveira, Heloisa Fonseca Marão, Leticia Cristina Cidreira Boaro, Lilian Costa Anami, Márcia Hiromi Tanaka, William Cunha Brandt, o meu respeito e admiração por cada um. Obrigado por partilharem vossos conhecimentos.

Aos Professores Doutores Pedro Luiz Rosalen, Karina Cogo Muller e a Mestre Rafaela D. Parolina de Carvalho, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp, e a Mestre Juliana Guimarães Santos, pelo apoio total e empenho no desenvolvimento do experimento que resultou nesta dissertação.

Aos amigos que esse mestrado me trouxe, obrigado por dividirem comigo angústias, descobertas e conquistas.

Ao querido e ilustre Professor Doutor Wilson Roberto Sendyk, coordenador deste Mestrado, do qual tive o prazer de ser discípulo na minha graduação, 33 anos atrás, e agora, agradeço sua humildade e desprendimento em partilhar sua sabedoria e

conhecimento. Obrigado por ter me acolhido, Mestre.

A Professora Doutora Yeon Jung Kim, co-orientadora desse estudo, pela paciência e atenção, pela clareza em definir e organizar as etapas desse estudo, pelo exemplo de conhecimento e prática científica. Muito obrigado!

Agora, em especial, agradeço a minha cara orientadora, Professora Doutora Debora Pallos, que me acolheu, mesmo com minhas limitações, e foi o fator decisivo para que eu chegasse ao final desta jornada, sendo muito paciente e exigente ao mesmo tempo, cobrando e incentivando o desenvolvimento desse estudo, com um rigor científico exemplar. Me espelho em sua conduta como docente.

Muito obrigado!

*Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.*

*Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.
(“SÊ”, Pablo Neruda)*

RESUMO

Este trabalho se propôs a avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana para *P. gingivalis* da pomada Proheal® na interface pilar-implante em três diferentes tipos de conexões. Utilizou-se um total de 45 implantes dentários (Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil) da linha Supreme, 15 com conexões do tipo cone morse (CM), 15 hexágono interno (HI) e 15 hexágono externo (HE). Foram distribuídos cinco implantes de cada uma das três formas de conexão investigadas (CM, HE e HI) nos grupos experimentais: grupo controle, grupo clorexidina e grupo Proheal®. A atividade microbiana foi avaliada através da quantificação, extração de DNA e identificação das bactérias pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A pomada Proheal® e a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana positiva para *P. gingivalis* quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), independentemente do tipo de conexão pilar-implante testado. No grupo clorexidina, a conexão do tipo CM apresentou o menor crescimento de *P. gingivalis* ($p < 0,05$) quando comparado as conexões do tipo HI. No grupo Proheal® houve diferença estatística entre todos os tipos de conexão: CM, HE e HI ($p < 0,05$), tendo o menor crescimento bacteriano para a conexão do tipo HI e maior crescimento em HE. Concluiu-se, portanto, que a pomada Proheal® se mostrou tão eficaz quanto a clorexidina no controle de crescimento da *P. gingivalis* nos diferentes tipos de conexões testados.

Palavras-chave: Clorexidina, Iodofórmio, *Porphyromonas gingivalis*, Implantes dentários.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate in vitro the antimicrobial activity for *P. gingivalis* from the Proheal® pomade at the pillar-implant interface in three different types of connections. A total of 45 dental implants (Dentoflex, São Paulo, SP, Brazil) of the Supreme line were used. 15 with cone morse (CM), 15 internal hexagon (IH) and 15 external hexagon (EH) connections. Five implants of each of the three investigated forms of connection (CM, EH and IH) were distributed in the experimental groups: control group, chlorhexidine group, and Proheal® group. Microbial activity was evaluated through quantification, DNA extraction and identification of the bacteria by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The Proheal® pomade and chlorhexidine presented positive antimicrobial activity for *P. gingivalis* when compared to the control group ($p < 0.05$), regardless of the type of pillar-implant connection tested. In the chlorhexidine group, the CM type connection presented the lowest growth of *P. gingivalis* ($p < 0.05$) when compared to IH type connections. In the Proheal® group there was a statistical difference between all types of connection: CM, EH and IH ($p < 0.05$), with the lowest bacterial growth for IH type connection and higher EH growth. It was concluded, therefore, that the Proheal® pomade proved to be as effective as chlorhexidine in controlling the growth of *P. gingivalis* in the different types of connections tested.

Key words: Chlorhexidine, Iodoformium, *Porphyromonas gingivalis*, Dental implants.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Primers e sonda de PCR em tempo real utilizados neste estudo.....	33
Tabela 2 - Média e desvio padrão do número de bactérias <i>P. gingivalis</i> encontradas nos diferentes grupos experimentais.....	36

Lista de Figuras

Figura1 - Conexão do tipo (A) Hexágono Externo, (B) Cone Morse e (C) Hexágono Interno.....	19
Figura 2 - Colonização bacteriana (verde) e infiltrado inflamatório (azul e lilás) na região da interface pilar-implante.....	23
Figura 3 - Mecanismo de ação da <i>Porphyromonas gingivalis</i>	24
Figura 4 - Implante aparafusado com conexão pilar-implante submerso em meio de cultura (A), turbidez do meio de cultura após incubação em anaerobiose após 96 horas (B).....	29
Figura 5 - Fotos de microscopia óptica, aumento de 100 vezes, confirmando a presença de bactérias Gram negativas nas CPI CM (A), HE (B), HI (C).....	29
Figura 6 - Coleta de material para teste de atividade microbiana.....	31
Figura 7 - Aplicação dos produtos PH (A), CX (B).....	34
Figura 8 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas diferentes conexões dos grupos experimentais.....	37
Figura 9 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas conexões CM do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.....	37
Figura 10 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas conexões HI do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.....	38
Figura 11 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas conexões HE do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.....	38
Figura 12 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas diferentes conexões do grupo controle.....	39
Figura 13 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas diferentes conexões do grupo clorexidina.....	39
Figura 14 - Quantificação bacteriana de <i>P. gingivalis</i> nas diferentes conexões do grupo Proheal®.....	40

Lista de abreviaturas e símbolos

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>BHI</i>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>CHX</i>	<i>Clorexidina</i>
<i>CM</i>	<i>Cone Morse</i>
<i>CO₂</i>	<i>Dióxido de Carbono</i>
<i>CPI</i>	<i>Conexão Pilar-implante</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucléico</i>
<i>G</i>	<i>Gramas</i>
<i>H</i>	<i>Hora(s)</i>
<i>H₂</i>	<i>Hidrogênio</i>
<i>HE</i>	<i>Hexágono externo</i>
<i>HI</i>	<i>Hexágono interno</i>
<i>IPI</i>	<i>Interface pilar implante</i>
<i>Min</i>	<i>Minutos</i>
<i>ml</i>	<i>Mililitro</i>
<i>μL</i>	<i>Microlitro</i>
<i>mm</i>	<i>Milímetros</i>
<i>mg/mL</i>	<i>Miligrama por mililitro</i>
<i>N</i>	<i>Newton</i>
<i>N₂</i>	<i>Nitrogênio</i>
<i>Na</i>	<i>Sódio</i>
<i>NaCl</i>	<i>Cloreto de sódio</i>
<i>Nm</i>	<i>Nanômetro</i>
<i>PBS</i>	<i>Tampão fosfato-salino</i>
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Rpm</i>	<i>Rotações por minuto</i>
<i>qPCR</i>	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real</i>
<i>S</i>	<i>Segundos</i>
<i>TSB</i>	<i>Caldo Soja Trypticaseína</i>
<i>U</i>	<i>Unidade de massa atômica</i>
<i>UFC</i>	<i>Unidades formadoras de colônia</i>

%	<i>Porcento</i>
°C	<i>Graus Celsius</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 Tipos de conexão	18
3.2 Colonização bacteriana na interface pilar-implante.....	22
3.3 Pomada Proheal® e sua ação antimicrobiana.....	24
3.4 Eficácia do Digluconato de Clorexidina.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Validação da contaminação bacteriana dos implantes	28
4.1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	30
4.1.2 Extração de DNA.....	31
4.1.3 Detecção e quantificação bacteriana pela técnica do qPCR	33
4.2 Grupos experimentais.....	33
4.3 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Resultados intergrupos experimentais.....	37
5.2 Resultados intragrupos de conexão.....	38
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação protética implantossuportada é um procedimento confiável, amplamente utilizado como uma estratégia para substituir dentes comprometidos ou não tratáveis e reabilitar áreas edêntulas de maxila e mandíbula. Segundo a literatura, tal procedimento possui alto índice de sucesso além de bons resultados estéticos (Tettamanti et al., 2017).

Os sistemas de implante se diferem de acordo com a geometria de interface entre pilar e implante (IPI). A conexão entre implantes e seus respectivos pilares, ou *abutments*, pode se distinguir entre conexões externas, que apresentam um hexágono externo (HE) padrão na plataforma do implante; conexões internas, que compreendem uma variedade de morfologias como o hexágono interno (HI), octógono interno e trilobe interno; e ainda uma conexão interna cônica ou cone Morse (CM) que deve ser considerada uma categoria própria, uma vez que possui propriedades particulares (Schmitt et al., 2014).

Contudo, nenhum sistema de conexão atualmente em uso pode ser considerado claramente superior a outros em todos os aspectos, e ainda não está claro qual é a real ligação entre a morfologia interna da interface e a perda óssea peri-implantar (Caricasulo et al., 2018).

Controle inadequado de biofilme dental é considerado um fator de risco biológico para doenças relacionadas aos implantes. De fato, o acúmulo microbiano em torno de implantes dentários pode causar infecções nos tecidos peri-implantares, conhecidas como mucosite peri-implantar quando limitadas a tecidos moles e peri-implantite quando ocorre perda óssea ao redor do implante (Callan et al., 1998). Esta última condição resulta no desenvolvimento de bolsas peri-implantares as quais são as principais responsáveis pelas falhas e perdas dos implantes (Canullo et al., 2014). A infiltração de células inflamatórias e a perda de osso peri-implantar está associada a uma lacuna na ligação implante-pilar, as microfendas. Alguns minutos após a colocação do implante, inicia-se imediatamente a colonização bacteriana da superfície dos implantes e tecidos peri-implantares. Portanto, o ajuste preciso entre os componentes e a estabilidade mecânica do pilar protético são fundamentais para o sucesso a longo prazo (Costa et al., 2017).

A inflamação nos tecidos peri-implantares pode ser provocada pelo reservatório bacteriano que acomete a área de microinfiltração da interface pilar-implante. Tal espaço apesar de indesejado, é inevitável nas conexões dos implantes de duas peças e quando se tornam colonizados por bactérias, a proximidade desta interface de conexão com o osso adjacente, pode desencadear a doença peri-implantar (do Nascimento et al. 2011; Canullo et al., 2014).

O surgimento de bolsas profundas peri-implantares são decorrentes da colonização de bactérias anaeróbias, periodontopatogênicas, como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e a *Porphyromonas gingivalis* (Leonhardt et al., 1999).

Nesse contexto destaca-se a ação da *P. gingivalis*. Trata-se de um microrganismo capaz de invadir localmente os tecidos periodontais e driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro, através da desregulação das respostas imunes e inflamatórias (Mysak et al., 2014).

A *P. gingivalis* contribui significativamente para a patogênese da doença periodontal e peri-implantar, através da indução de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina 1 e 6 pelos linfócitos T CD4+. O evento inicial de sua patogenicidade é a interação (aderência) à cavidade oral. Para conseguir essa aderência *P. gingivalis* utiliza vários componentes bacterianos como fímbrias, proteases, hemaglutininas e lipopolissacarídeos. As fímbrias da *P. gingivalis* participam de quase todas as interações entre a bactéria e o hospedeiro, e entre a bactéria e outras bactérias (Mysak et al., 2014).

Esta estrutura é a maior determinante adesiva à superfície deste agente patogênico, e é crítica para uma colonização com sucesso e para a progressão da doença periodontal e peri-implantar (Mysak et al., 2014).

A colonização bacteriana na IPI dos diferentes tipos de conexão dos sistemas de implantes e suas possíveis consequências nos tecidos peri-implantares são amplamente discutidas na literatura (Canullo et al., 2014; D'Ercole et al. 2014; Gherlone et al., 2016; Sasada e Cochran, 2017).

A aderência de bactérias sobre as superfícies dos implantes e seus componentes é a principal fonte de infecção para os tecidos peri-implantares e, conseqüentemente desenvolvimento de peri-implantites. Alguns fatores podem interferir no aumento ou diminuição da aderência bacteriana, como por exemplo o desenho interno do implante, tipo de conexão, tratamento de superfície, técnica

cirúrgica empregada, uso de agentes antimicrobianos associados aos materiais preenchedores dentre outros (Pier-Francesco et al., 2006).

Dentre os principais antimicrobianos associados aos preenchedores tem-se o iodofórmio e o digluconato de clorexidina. O iodofórmio possui ação detergente, desinfetante e desodorizante devido a sua capacidade de oxidação e do poder redutor do iodo sobre as secreções bacterianas. Tal substância é um dos componentes da pomada Proheal[®] que é utilizada para preencher espaços entre os componentes dos implantes e próteses (Pucci, 1945; Carneiro, 2006). A endodontia se favorece bastante da propriedade estimulante do iodofórmio, pois proporciona uma reação inflamatória inicial, atraindo células de defesa para a região, especialmente leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, induzindo a formação de tecido de granulação inicialmente e, posteriormente, induzindo a neoformação óssea (Daniel et al., 1999).

Além da endodontia, outras áreas da odontologia vêm se beneficiando do uso do iodofórmio na pomada Proheal[®]. Mais recentemente, Cruz et al. (2013), compararam o uso de fios de sutura revestidos com a pomada anti-séptica com fios de sutura convencionais *in vivo*. Foi observado que o grupo que utilizou fio de sutura revestido com a pomada iodoformada apresentou crescimento bacteriano inferior ao grupo que utilizou fios de suturas convencionais.

A clorexidina é considerada como padrão ouro na prevenção da colonização bacteriana na IPI, devido a sua substantividade perante aos tecidos. Em pH fisiológico, a clorexidina interage com as cargas negativas da parede da célula bacteriana, se aderindo ou incorporando-se a mesma (Rosenthal et al., 2004; Hortense et al., 2010; Kluk et al., 2016).

O uso de agentes antimicrobianos como a clorexidina ou o iodofórmio, incorporados aos preenchedores utilizados nesta interface com o objetivo de diminuir ou prevenir a atividade microbiana têm sido pouco investigados.

Desse modo, este estudo se propôs a avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana da pomada a base de iodofórmio Proheal[®] como uma forma de embasar o uso de agentes antimicrobianos na superfície das conexões pilar-implante.

2 OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana da pomada Proheal® na interface pilar-implante em três diferentes tipos de conexões.

A hipótese nula desta pesquisa é que o agente antimicrobiano em questão não possui atividade antimicrobiana na IPI, independente do tipo de conexão utilizada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O advento dos implantes dentários osseointegrados criou novas possibilidades no campo da reabilitação protética para pacientes total ou parcialmente desdentados (Tettamanti et al., 2017).

No entanto, apesar das altas taxas de sucesso deste procedimento, o risco de falha e consequente perda, é a principal complicação da implantodontia. Um dos fatores que pode levar ao insucesso da técnica é a peri-implantite, que pode ter causas mecânicas ou biológicas (do Nascimento et al. 2011; Canullo et al., 2014; Tettamanti et al., 2017).

Novas tecnologias relacionadas aos implantes osseointegráveis são lançadas com o objetivo de garantir uma melhoria constante na qualidade do tratamento de reabilitação, devido a melhorias na qualidade biomecânica, na estética e nas soluções clínicas. Os alvos destes avanços estão relacionados principalmente ao desenho e estrutura tridimensional dos implantes e seus diferentes sistemas de conexão (Smeets et al., 2016).

3.1 Tipos de conexão

A conexão pilar-implante (CPI) deve ser considerada uma área estratégica para o sucesso a longo prazo de uma reabilitação prótese-implante, uma vez que está profundamente envolvida em complicações biológicas e técnicas, desempenhando um papel central (Caricasulo et al., 2018).

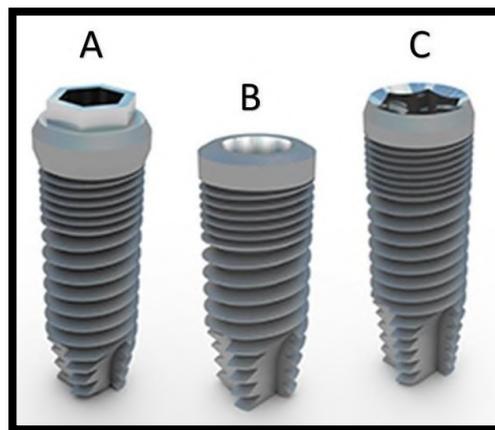
Muitos tipos de conexões de pilares de implantes estão disponíveis no mercado. Os desenhos mais comuns são internos, onde uma parte do pilar é inserido no corpo do implante e externa, onde o pilar é colocado acima do implante (Gherlone et al., 2016).

O desenho do HE (Figura 1A), tinha originalmente a pretensão de ser um mecanismo de acoplamento e transferência de torque rotacional, consequentemente envolvido por necessidade em um mecanismo de indexação protética e anti-rotacional. Para superar as limitações inerentes ao seu desenho, alguns fabricantes propuseram tipos de conexões alternativas com o objetivo de gerar efeito anti-

rotacional aumentando a estabilidade da junção, como por exemplo as conexões HI (Figura 1C) (Akour et al., 2005; Sasada e Cochran, 2017).

O princípio básico do sistema de CM, "um cone dentro de um cone", resulta não apenas na capacidade de vedação da interface entre o pilar e das paredes internas do corpo do implante, mas também em uma maior estabilidade entre os dois componentes. Um CM é definido pelo ângulo que as superfícies cônicas fazem em relação ao eixo longitudinal do componente e pelo ângulo de diferença entre a parte macho e a parte fêmea (Figura 1B) (Sasada e Cochran, 2017).

Figura 1 - Conexão do tipo (A) Hexágono Externo, (B) Cone Morse e (C) Hexágono Interno.



Fonte: Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil

Sistemas de conexão externa mais comuns são compostos de HE. Estes possuem como desvantagens o pequeno comprimento de contato entre a restauração e a parte hexagonal da cabeça do implante e fato de existir um grau de rotação entre a plataforma e o hexágono interno da restauração. Existe dessa forma uma grande tensão criada na conexão do parafuso. No sistema hexagonal interno, o hexágono e o parafuso passam para o corpo do implante, de modo que o componente protético é mais estável (Figura 1C). A força gerada nesse tipo de conexão é dissipada para as paredes adjacentes ao hexágono do implante (Larrucea Verdugo et al., 2014).

Há algum tempo se discute sobre o impacto do tipo de conexão na colonização bacteriana. Piattelli et al. (2001), compararam a infiltração bacteriana em implantes parafusados e cimentados por meio de microscopia eletrônica de varredura, análise de penetração de fluido e análise de penetração bacteriana na IPI. Em todos os

implantes parafusados observou-se penetração bacteriana na IPI, e nos implantes cimentadas não foram detectadas as bactérias na parte oca do implante. Concluíram então que os implantes cimentados oferecem um melhor resultado em termo de permeabilidade bacteriana e de fluido, em comparação aos implantes parafusadas, uma vez que oferecem o cimento como a barreira mecânica.

Tesmer et al. (2009), realizaram estudo *in vitro* para verificar a influência da geometria das CPI na colonização bacteriana dessa interface. Foram utilizados 30 implantes, divididos conforme suas CPI. Grupo 1 (n=10) com CPI CM com pilar standard, grupo 2 (n=10) com CPI CM e pilar modificado com sulco vertical, feito por broca, com profundidade de 0,5 mm em um lado do mesmo e grupo 3 (n=10) com CPI conexão interna triglobo. Os pilares dos grupos 1, 2 e 3, foram conectados aos implantes imersos em solução bacteriana contendo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Como resultado, obtiveram que 3 das 10 amostras do grupo 1, desenvolveram 1 UFC de Aa, enquanto 0 de 10, desenvolveram UFC para Pg. Dez dos 10 implantes dos grupos 2 e 3 desenvolveram UFC para Aa, e 9 de 10 implantes, para Pg. Concluíram que esse estudo indica que desenhos diferentes dos implantes podem afetar potencialmente a colonização bacteriana das CPI, através de suas microfendas.

Assenza et al. (2012), avaliaram *in vitro*, a contaminação bacteriana em CPI de CM, cimentadas e HI. Utilizaram 30 implantes (grupo 1 CM, grupo 2 HI e grupo 3 conexão cimentada) com 10 em cada. Cinco implantes tiveram seu interior inoculado com cultura de *Pseudomonas aeruginosa* e 5 com cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em condições estéreis, sendo então, os pilares aparafusados e no grupo 3, cimentadas, sendo submersos em solução nutriente estéril. Como resultado, obtiveram, nas CPI CM foi encontrada contaminação no 22º dia em um dos cinco conjuntos semeados com *P. aeruginosa*. Nas amostras de conexão CM inoculadas com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, nenhuma contaminação foi observada. Nas conexões cimentadas (grupo 3), não foi encontrada contaminação em nenhum dos conjuntos inoculados com *P. aeruginosa* ou *A. actinomycetemcomitans*. Nas conexões do grupo 2, houve contaminação em ambos os grupos, observada pela turbidez do meio que envolvia os conjuntos. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos 1 e 3 ($p > 0,05$), evidenciando diferença estatística entre os grupos 2 e 1 ($p < 0,05$) e entre grupos 2 e 3 ($p < 0,01$). O estudo conclui que conexões do tipo HI apresentam hermeticidade

nas conexões cimentadas, baixa permeabilidade nas cônicas e alta permeabilidade às bactérias nas conexões HI.

Mancini et al., (2016), realizaram estudo onde avaliaram a capacidade de selamento entre o meio interno e o meio externo de um implante com características macromorfológicas em seu desenho, feitas para aumentar o contato, entre pilar e implante, através da diminuição dos *microgaps* e micromovimentos. Foi analisada a passagem de bactérias através da CPI. Duas espécies de bactérias foram utilizadas (*P. gingivalis* e *Tannerella forsythia*), cultivadas em meio de cultura (LB) contendo kanamicina e ampicilina, entre 12 e 24 horas, em incubadora. Após 48 horas, as CPI foram desconectadas e amostras colhidas, em ambos os grupos, nas partes interna e externa dos implantes. Foi realizada a extração do DNA e a quantificação bacteriana foi realizada pela Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os resultados obtidos mostraram que no grupo de estudo houve contaminação tanto interna quanto externa às CPI, com significância estatística em relação à quantidade de bactérias. Como conclusão, frente aos resultados observados, o desenho do implante foi eficaz em reduzir a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que demonstrou que nenhuma CPI é totalmente eficaz em impedir, via perfeita vedação, a troca de fluidos entre meio externo e o interior dos implantes

El Haddad et al. (2016), desenvolveram um estudo *in vitro* para pesquisar a colonização bacteriana na CPI e a penetração de bactérias no interior dos implantes, tendo em vista a relação direta deste processo com a instalação da peri-implantite. Utilizaram 2 espécies de bactérias, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, e 2 antibióticos (Kanamicina e Ampicilina), cultivados em incubadoras. Após 48 hs, os implantes foram reabertos e procedeu-se a execução do qPCR para quantificação das bactérias. Os resultados mostraram que houve crescimento bacteriano tanto na parte interna quanto na externa dos implantes do grupo de estudo, com significativa diferença entre a concentração bacteriana no meio interno e no meio externo dos implantes. Concluíram então que nenhuma CPI conseguiu vedar totalmente as microfendas, podendo as bactérias da peri-implantite serem as principais causas de falha dos implantes.

Em uma revisão sistemática para avaliar a capacidade de vedação de diferentes conexões de implantes contra a microinfiltração, Mishra, Chowdhary e Kumari (2017) concluíram que implantes HE falharam completamente na prevenção das mesmas em condições de carga estática e dinâmica dos implantes. Os implantes de HI, principalmente os CM, mostraram-se promissores no caso de carregamento

estático e também apresentaram menor microinfiltração em condições de carga dinâmica. Os autores ressaltam que o torque recomendado pelo fabricante deve ser seguido estritamente para obter uma vedação melhor na interface do implante do pilar. Caricasulo et al. (2018) em sua metanálise sugerem que há uma diferença significativa entre as conexões externas e cônicas em relação aos efeitos do tipo de conexão nos níveis ósseos marginais peri-implantares e que tal diferença foi menos evidente para conexões internas e cônicas. Os autores concluem que a perda óssea peri-implantar é geralmente menor a curto-médio prazo quando tipos internos de interface são adotados e que conexões cônicas parecem ser mais vantajosas, garantindo melhor desempenho de vedação e estabilidade da interface implante-pilar. Entretanto segundo os autores, essas informações foram obtidas especialmente por estudos *in vitro* ou trabalhos *in vivo* com seguimento curto, o que pode estar relacionado a vieses e falhas clínicas.

3.2 Colonização bacteriana na interface pilar-implante

O desenho da IPI provoca um impacto na quantidade de infiltração microbiana entre as duas partes (Gherlone et al., 2016).

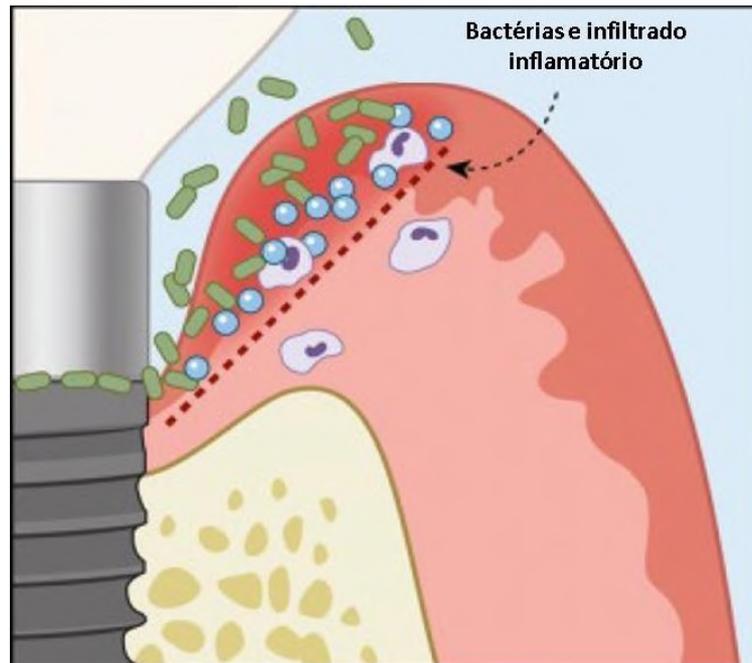
Microinfiltração bacteriana na IPI acarreta no aumento do contingente de células inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares ao nível, ou ligeiramente coronal a junção pilar-implante (Figura 2) (Broggini et al., 2003; Sasada e Cochran, 2017). As bactérias encontradas neste espaço podem ser anaeróbicas estritas e facultativas, dependendo das características deste micro-habitat, as quais representam uma fonte potencial de inflamação tecidual que pode provocar reabsorção óssea (Gherlone et al., 2016; Carinci et al., 2016).

A microbiota associada à peri-implantite é muito semelhante à das doenças periodontais. Aumento na profundidade de bolsa e perda óssea estão associados a mudanças significativas na composição da microbiota subgingival, incluindo: aumento da carga total de bactérias, com valores mais elevados de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, espécies de *Fusobacterium*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* (Ata-Ali et al., 2011).

Enquanto a microbiota fundamentalmente aeróbica sem mobilidade não está associada à doença, os complexos “laranja” (*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micros*)

e “vermelho” (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) estão relacionados na patogênese da periodontite (Mysak et al., 2014; Mencio et al., 2017).

Figura 2 - Colonização bacteriana (verde) e infiltrado inflamatório (azul e lilás) na região da interface pilar-implante.



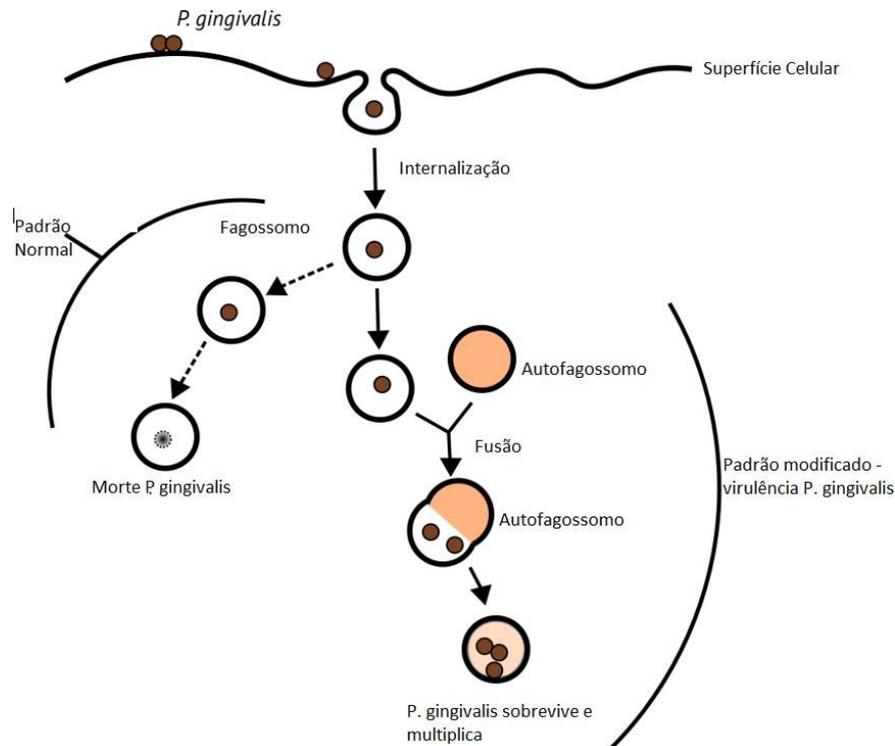
Fonte: Sasada e Cochran, 2017

P. gingivalis especialmente, orchestra a patogênese da doença periodontal e peri-implantar, pois, estimula a autofagia celular para fornecer um nicho de replicação, suprimindo por consequência a morte celular. O vacúolo replicante contém proteínas hospedeiras entregues por autofagia que são usadas por este patógeno assacarítico para sobreviver e replicar dentro da célula hospedeira. Quando a autofagia é suprimida pela 3-metiladenina, a *P. gingivalis* internalizada transita para o fagolisossomo onde é destruída e degradada. Por esse motivo, a sobrevivência dela depende da ativação da autofagia e da sobrevivência da célula hospedeira endotelial, mas o mecanismo pelo qual *Porphyromonas gingivalis* realiza todo esse processo ainda não é claro (Figura 3) (Mysak et al., 2014).

Em um ensaio clínico randomizado, Mencio et al. (2017) avaliaram a microbiota de bactérias peri-implantares em dois tipos diferentes de sistemas de conexão pilar-implante (grupo 1 parafusada e grupo 2 cimentada) após pelo menos 360 dias de carga protética. Os autores encontraram maior risco de desenvolver peri-implantite no

grupo com conexões aparafusadas, uma vez que o mesmo apresentou grande contingente de bactérias patogênicas do complexo “vermelho” acima do limiar patogênico. Segundo os autores, os dados do exame clínico confirmaram a hipótese de uma correlação entre o tipo de conexão e a presença de bactérias patogênicas periodontais.

Figura 3 - Mecanismo de ação da *Porphyromonas gingivalis*.



Fonte: Adaptado de Olsen e Progulske-Fox, 2015

No entanto, fatores outros podem influenciar a doença como a suscetibilidade individual do hospedeiro, a presença de espécies bacterianas interagentes e o microambiente da bolsa periodontal (Mencio et al., 2017).

3.3 Pomada Proheal® e sua ação antimicrobiana

A literatura descreve que a localização supra gengival da plataforma do implante, o uso de conexões CM, de um anel de silicone entre o pilar e o implante ou até mesmo a aplicação de agentes antibacterianos dentro dos implantes como

recursos utilizados para prevenir a microinfiltração bacteriana (Binon, 2000; Cruz e Castro, 2001; Duarte et al., 2006; Paolantonio et al., 2008).

Alguns agentes foram testados de diversas formas no *Clinical Center of Research in Stomatology* com resultados insatisfatórios. O principal problema encontrado pelos pesquisadores foi a ausência de estabilidade e durabilidade dos antissépticos, antibióticos e dos veículos utilizados. Devido a esses resultados, iniciou-se uma busca por uma opção mais efetiva, um longo tempo de ação com componentes que permaneciam estáveis e duráveis dentro do organismo enquanto em contato com fluidos orgânicos (Cruz, 1997).

Um agente cimentante e antisséptico Proheal® (BiomacMed, Juiz de Fora/MG, Brasil) vem sendo testado e utilizado clinicamente neste controle microbiano dos espaços interconectores, com resultados satisfatórios (Carneiro et al., 2016). A pomada Proheal® foi desenvolvida com a finalidade de controle da colonização bacteriana nos implantes. Sua formulação inclui em maior proporção iodofórmio (12,85%) e óleo de calêndula (4,1%) em sua composição. Cera de abelha, lanolina e nipazol também são encontradas em menor proporção na formulação. Pastas a base de iodofórmio apresentam boa eficácia antibacteriana para bactérias anaeróbias e aeróbicas (Cruz, 2002; Iauk et al., 2003).

O iodofórmio (CHI_3) é uma substância amarelo claro, com peso atômico de 126,92u, altamente radiopaca, pouco solúvel em água (1:1000), solúvel em álcool (1,60) e éter (1,75). Sua solubilidade em contato com líquidos orgânicos, liberando lentamente o iodo, confere sua capacidade de ação antisséptica, suave e persistente. É comumente utilizado como radiopacificador para preenchimento de canal radicular de dentes decíduos e seu uso na endodontia é controverso devido ao seu potencial para causar efeitos tóxicos (Carneiro, 2006).

Acredita-se que o iodo, que é um agente oxidante, pode oxidar irreversivelmente e, assim, inativar compostos metabólicos essenciais como proteínas, nucleotídeos e ácidos graxos, resultando na morte celular. (Saggar et al., 1996).

Os agentes antibacterianos mais comuns descritos para o controle da colonização bacteriana na IPI incluem o gel de tetraciclina, a pomada Neosporin®, o gel de clorexidina, e a pomada Proheal® (Duarte et al., 2006; Paolantonio et al., 2008). Segundo Van Assche et al. (2011) tal pomada apresenta maior efeito antibacteriano

contra bactérias do complexo vermelho anaeróbio, que são importantes colonizadoras bolsas peri-implantares.

Dentre suas indicações, o produto tem as funções de preenchimento dos espaços vazios, vedação e controle microbiano do ambiente intrainplante e intercomponentes protéticos dos implantes e próteses. Devido às suas propriedades físicas, ao preencher os espaços das interconexões, veda-os à penetração de microrganismos e, pela sua ação antisséptica, controla quimicamente a multiplicação dos microrganismos presentes e daqueles que possam vir a penetrar os espaços internos (Carneiro et al., 2016).

3.4 Eficácia do Digluconato de Clorexidina

Com 30 anos de história na odontologia, o digluconato de clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) é a solução mais utilizada e pesquisada nos últimos anos, por possuir boa eficácia na ação antibacteriana (Kluk et al., 2016). Pode ser utilizado de várias formas e concentrações nas soluções, atua no tratamento de feridas, queimaduras, antisséptico urinário e das mucosas. Na cavidade oral encontramos ainda outras formas de empregá-lo como irrigações, spray, goma de mascar e vernizes (Hortense et al., 2010).

Ainda, é capaz de auxiliar na diminuição do biofilme dental presente na cavidade bucal, o qual leva a injúrias à saúde bucal do indivíduo. A molécula presente no dentífrício e no enxaguante bucal apresenta biocompatibilidade aos tecidos bucais, não provocando irritações desde (Hortense et al., 2010).

Alguns autores descrevem efeitos colaterais que podem estar associados à clorexidina, como o manchamento extrínseco dos tecidos bucais (dentes e língua), presença de gosto metálico na boca, sensação de queimação, perda de paladar, descamação da mucosa e reações alérgicas (Bonan et al., 2011; Kluk et al., 2016).

Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. Ela possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Zanatta e Rosing, 2007).

Devido à sua natureza catiônica, ela adsorve a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme

dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (Zanatta e Rosing, 2007).

O seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente. Assim, em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (Zanatta e Rosing, 2007).

Com a sua capacidade antisséptica junto à adsorção, tributo de suma importância que é o poder de retenção na superfície oral e de fazer lentamente a liberação, a interação eletrostática de grupos com cargas negativas existentes na cavidade bucal, como dentes e biofilme.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Validação da contaminação bacteriana dos implantes

Esta parte do estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Com o intuito de estabelecer uma metodologia para viabilizar a detecção de contaminação por *Porphyromonas gingivalis* foi realizado um estudo piloto, onde foi inserido no interior dos implantes de diferentes conexões um inóculo de *P. gingivalis* com densidade óptica (DO) 0,5 da escala padrão de Macfarland, seguido de diluição em meio de cultura para 5 ml.

Dois implantes de cada tipo de conexão (CM, HI e HE) estéreis, foram aparafusados, com torque indicado pelo fabricante e manuseados por um único pesquisador treinado, e imersos em tubos de ensaio com meio de cultura, sendo submetidos a agitação em Orbital Shaker 211DS (Labnet, Edison, NJ, USA) por 30 minutos, a 150 rpm, sendo então levados à câmara de anaerobiose. A cada 24 horas repetiu-se a agitação em Orbital Shaker. Realizou-se a troca do meio de inóculo após 48 horas, sendo novamente realizada a agitação diária no Orbital Shaker e mantido em anaerobiose por mais 48 horas em câmara de anaerobiose (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Bingley, UK).

Quando as conexões foram removidas, o material do interior dos implantes foi colhido para confecção de esfregaço de lâminas e realização de coloração de Gram, onde observou-se através da análise de lâminas no microscópio Axiostar Zeiss (Zeiss International, Oberkochen, Germany) que houve contaminação em todas as amostras (Figura 4 e 5).

Figura 4 - Implante aparafusado com conexão pilar-implante submerso em meio de cultura (A), turbidez do meio de cultura após incubação em anaerobiose após 96 horas (B).

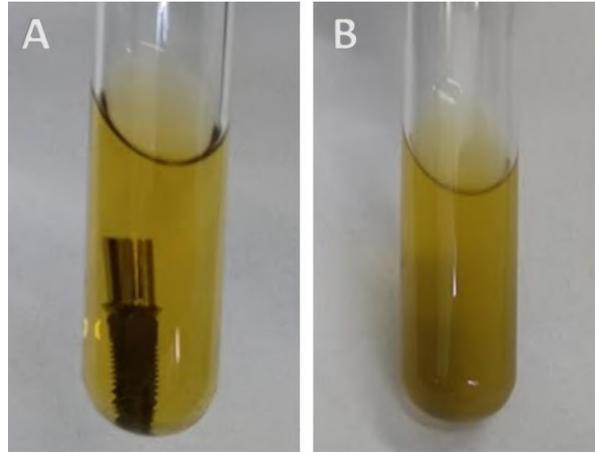
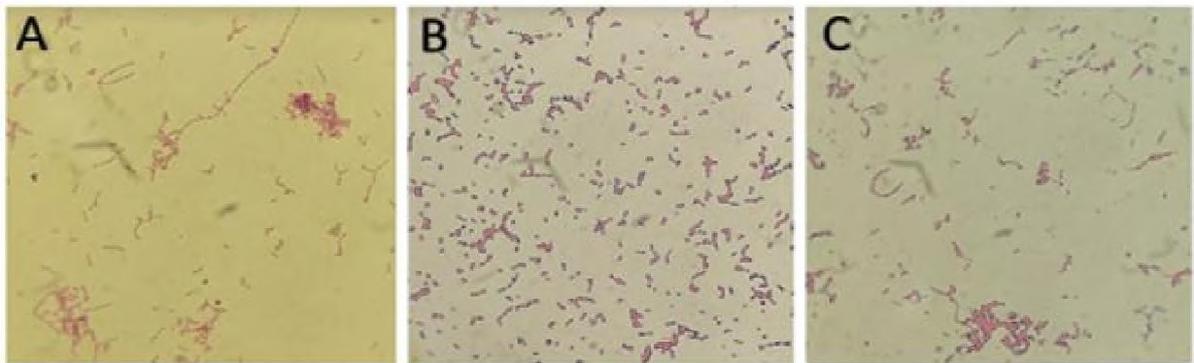


Figura 5 - Fotos de microscopia óptica, aumento de 100 vezes, confirmando a presença de bactérias Gram negativas nas CPI CM (A), HE (B), HI (C).



Um segundo estudo piloto foi realizado, seguindo o mesmo modelo, porém com o acréscimo da pasta Proheal® no interior de um dos implantes de cada conexão. O mesmo foi realizado com a clorexidina. Ao final deste experimento, a coloração de Gram e a análise microscópica, confirmaram a contaminação de todas as amostras por *P. gingivalis*. A partir deste resultado, optou-se pela realização do experimento com maior número de amostras.

4.1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se cepas de *Porphyromonas gingivalis* W83. Placas de *P. gingivalis* foram rotineiramente cultivadas em meio sólido de Tryptic soy agar (TSA-Difco) suplementado com extrato de levedura a 0,2% (Difco, Becton Dickinson, EUA), sangue desfibrinado de carneiro a 7%, 5 µL de hemina (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e 1mg/mL de menadiona (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), a cada 48 h, sob condições de anaerobiose, a 37°C (10% de CO₂, 10% de H₂ e 80% de N₂; MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley, Shipley, Reino Unido).

Caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com Solução Tampão Fosfato Salina (TSB), suplementado com extrato de levedura a 0,2% (Difco, Becton Dickinson, EUA), 5µL de hemina (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e 1 mg/mL de menadiona (HM) (Sigma, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) foi usado como meio de cultura para apoiar o crescimento bacteriano.

Para o preparo do inóculo bacteriano, colônias bacterianas crescidas em placas foram ressuspendidas em meio TSB-BHI-HM e deixadas por mais 18 h em anaerobiose. A turbidez do meio foi ajustada para o padrão Mcfarland de 0,5 (padronização em espectrofotômetro). Isso resultou numa suspensão contendo, aproximadamente 5.10⁷UFC/mL (DO 0.5, 660 nm).

Essa suspensão bacteriana foi acrescentada em tubos contendo 4,5 ml de TSB-BHI-HM e o implante dentário, conectado ao seu pilar, com torque de 32N, conforme indicado pelo fabricante, contendo uma das substâncias de teste em seu interior, sendo essa parte do experimento realizada em cabine de biossegurança de fluxo laminar vertical TELSTAR BioUltra (TELSTAR, Bristol, PA, USA). Foram submetidos a agitação no Orbital Shaker 211DS (Labnet, Edison, NJ, USA) por 30 minutos, com 150 rpm, a 37°C e então incubados em anaerobiose. O tempo de exposição do implante na suspensão bacteriana foi de 5 dias. Logo, esta primeira etapa foi considerada como Dia 1 do experimento.

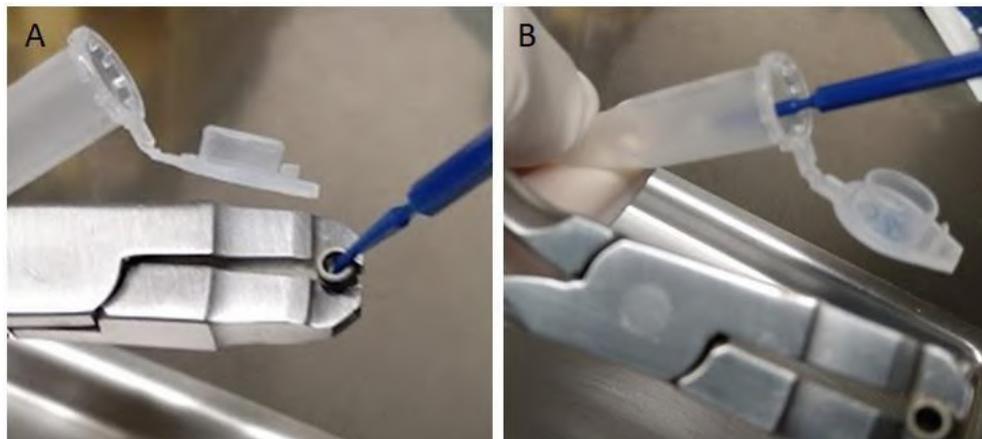
Após 24 horas, os tubos foram retirados da câmara e submetidos à agitação, no Orbital Shaker, conforme descrição acima e incubados novamente em anaerobiose (Dia 2). Após mais 24 horas, os implantes foram colocados em novos tubos, ocorrendo troca do meio de cultura e do inóculo, submetidos agitação e incubados novamente

(Dia 3). No Dia 4 foram retirados apenas para agitação, retornando à câmara de anaerobiose e, no Dia 5, foi realizada a reabertura dos implantes.

Ao serem retirados dos tubos, os implantes foram lavados 2 vezes, por submersão em NaCl a 0,9%, desaparafusados e, com auxílio de microaplicador (KG Sorensen, SP, Brasil) estéril, o conteúdo da parte interna do implante foi removido (realizando 3 vezes esfregação contra a parede do mesmo) e transferido para um Eppendorf contendo solução de PBS 1x (Figura 6). Esse microaplicador ficou na solução por 10 segundos, submetida a agitação manual, pressionada contra a parede do Eppendorf e então descartada. Foi realizada a lavagem da parte interna do implante com 10 μ L da solução PBS e o volume final obtido no Eppendorf foi de 485 μ L. As amostras foram então congeladas a -20°C para posterior análise de qPCR.

O material coletado foi acondicionado em microtubos para processamento de extração do DNA, quantificação e identificação das bactérias pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando o Kit TaqMan Assays (Thermo Fischer Scientific, Waltham, EUA), segundo as instruções do fabricante.

Figura 6 - Coleta de material para teste de atividade microbiana



4.1.2 Extração de DNA

Esta parte do estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular (LCMbio URC) da Universidade de Santo Amaro.

Para o protocolo de extração de DNA (purificação genômica), utilizou-se PureLink Genomic DNA Mini Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante.

Para se preparar os lisados de células bacterianas Gram-, preparou-se o bloco de calor a 55°C, utilizando *pellet* de células congeladas. O *pellet* de células em 180µL de PL Genomic Digestion Buffer (PLGDB) foi ressuspendido. Acrescentou-se 20µL de Proteinase K para lisar as células. Após breve mistura em vórtex, incubou o tubo a 55°C, com ocasionais vórtex (vórtices), até se completar a lise (1 h). Acrescentou-se então 20µL de RNase ao lisado, misturando com vórtex e o incubou à temperatura ambiente por 2 min.

Acrescentou-se ainda 200µL de PL Genomic Lysis/Binding Buffer (PLGLBB) misturado através de vórtex para obter solução homogênea e 200µL de etanol 96-100% ao lisado (misturado posteriormente por vórtex por 5 segundos, para homogeneização).

O procedimento de purificação foi projetado para a purificação genômica do DNA utilizando *spin columns*, com centrifugação entre 10 e 15 minutos, em tempo total. Acrescentou-se inicialmente etanol 96-100% ao PureLink Genomic Washer Buffer 1 (PLGWB) 1 e ao PureLink Genomic Washer Buffer 2 (PLGWB 2) de acordo com as instruções em cada etiqueta. Se misturou e as etiquetas onde o etanol foi acrescido foram marcadas. Ambas soluções com etanol foram guardadas à temperatura ambiente.

Para se realizar o *binding* DNA foi necessário remover uma PLSC em 1 tubo de coleta da embalagem, acrescentar o lisado (~ 640µL) preparado com PLGL/BB e etanol à PLSC e posteriormente, centrifugar a coluna a 10000xg por 1 minuto à temperatura ambiente. Depois, o tubo coletor foi descartado e a *spin column* foi colocada dentro de PL tubo coletor limpo.

Acrescentou-se 500µL de PLGWB 1 e etanol à coluna de rotação e foi feita a centrifugação da mesma à temperatura ambiente por 1 minuto, a 10000xg. O tubo coletor foi descartado e a *spin column* foi colocada em um tubo coletor limpo do kit, onde foi acrescentado 500µL de PLGWB 2 e etanol à coluna que foi centrifugada à velocidade máxima por 3 minutos a temperatura ambiente.

A *spin column* foi então alocada em tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml, onde acrescentou-se 25-200µL de PureLink Genomic Elution Buffer (PLGEB) à coluna. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, a *spin column* foi centrifugada a velocidade máxima por 1 min a temperatura ambiente. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

4.1.3 Detecção e quantificação bacteriana pela técnica do qPCR

Conforme a metodologia descrita por Nonnenmacher et al. (2004), os *primers* e sondas utilizados para a detecção e quantificação de periodontopatógenos são apresentados na Tabela 1. Os *primers* e sondas (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) foram selecionados usando o software Primer Express V 1.0 (Applied Biosystems International) e foram baseados em regiões altamente conservadas específicas de espécies do gene 16S rRNA.

Tabela 1: Primers e sonda de PCR em tempo real utilizados neste estudo.

Primers	Sequência
<i>P. gingivalis</i> F	ACCTTACCCGGGATTGAAATG
<i>P. gingivalis</i> R	CAACCATGCAGCACCTAGAA
Sonda	Sequência
<i>P. gingivalis</i> Pr	VIC-ATGACTGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC-TAMRA

As amostras foram testadas em uma mistura de reação 25- μ l contendo 2,5 μ l de DNA molde, 2,5 μ l de TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG, 1,5 μ l de MgCl₂, 1 dNTP μ l, 12,5 pmol de Custom TaqMan® Primer e 3,75 pmol da sonda Custom TaqMan® TAMRA. Na ciclagem, as condições utilizadas foram as seguintes: 95^oC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95^o C por 15 segundos e 60^o C por 1 minuto cada. Nesse processo foi utilizado o Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) para a amplificação por PCR em tempo real monitorado, analisando quantitativamente as emissões de fluorescência.

4.2 Grupos experimentais

Um total de 45 implantes dentários com conexões do tipo CM (n= 15), HI (n= 15) e HE (n=15), da linha Supreme, (Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil), foram utilizados. Todos os implantes possuíam 11,5 mm de comprimento por 3,75 mm de

diâmetro. Eles foram utilizados no ensaio de penetração de microrganismos de um meio externo para o interior dos implantes através de suas conexões pilar-implante. Os implantes, estéreis, tiveram seu interior preenchidos com materiais de acordo com os grupos experimentais: Proheal® pomada (BioMacmed, Juiz de Fora, MG, Brasil) e Clorexidina gel 2% (Clorexoral, Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil).

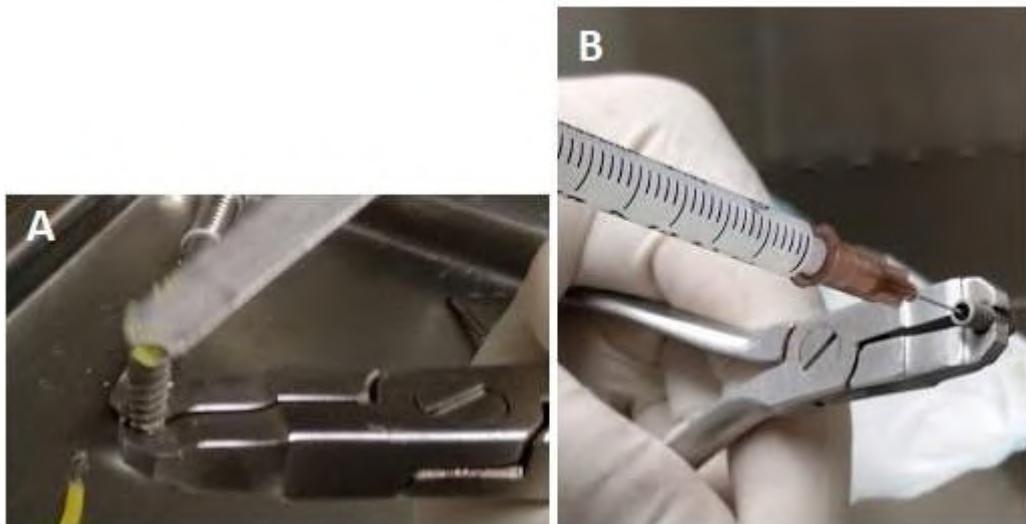
Grupo Proheal® (PH) – A pomada Proheal® foi introduzida no interior de seu grupo de implantes através de espátula estéril, até a borda dos implantes sendo então realizado o torque na conexão pilar-implante (Figura 7A).

Grupo Clorexidina (CX) – A clorexidina gel 2% foi introduzida no interior do seu grupo de implantes, via seringa e agulhas estéreis, preenchido até a borda em cada implante, sendo então realizada o torque na conexão pilar-implante (Figura 7B).

Grupo Controle – Grupo sem a utilização de substância antimicrobiana em seu interior.

Em seguida as conexões foram aparafusadas ao implante com torque de 32 N (conforme recomendado pelo fabricante). Possíveis excessos dos produtos utilizados foram removidos com gazes estéreis na parte externa das CPI, sendo então os implantes acondicionados em tubos de vidro contendo o inóculo.

Figura 7 - Aplicação dos produtos PH (A), CX (B).



4.3 Análise estatística

As análises foram realizadas usando as versões 5.0 do GraphPad Biostat Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para avaliar a normalidade dos grupos, o teste de Kolmogorov-Smirnov, indicado quando a distribuição indicada na hipótese nula está completamente especificada e número de amostras pequena, foi aplicado. Os dados foram então analisados utilizando-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparação da quantidade de bactérias *P. gingivalis* encontradas nos diferentes grupos experimentais e o teste Mann-Whitney para comparação entre os diferentes tipos de conexões pilar-implante. Um nível de significância de 5% foi utilizado em todas as análises.

5 RESULTADOS

A pomada Proheal® e a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana para

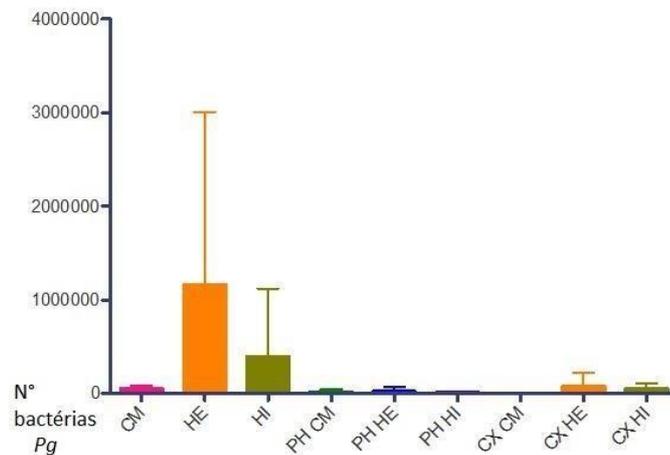
P. gingivalis, quando acondicionadas nos diferentes tipos de conexões pilar-implante. A quantificação média do contingente de cepas bacterianas detectadas nos grupos experimentais, a saber, controle (CM, HE e HI), Proheal® (PH CM, PH HE e PH HI) e Clorexidina (CX CM, CX HE e CX HI) está respectivamente expressa na Tabela 2 e Figura 8. Neste estudo, observou-se menor contingente de *P. gingivalis* em conexões pilar-implante do tipo HE utilizando-se pomada Proheal®.

Tabela 2 - Média e desvio padrão do número de bactérias *P. Gingivalis* encontradas nos diferentes grupos experimentais.

Grupo experimental	Média do nº de bactérias <i>Pg</i> (DP)
CM	93774,25 (71486,23)
HE	2138843,29 (2797886,08)
HI	171417,04 (131308,74)
PH CM	2960,37 (2798,19)
PH HE	1041,70 (1283,29)
PH HI	17380,10 (15704,44)
CX CM	4278,39 (1120,81)
CX HE	201120,87 (369609,32)
CX HI	29925,96 (23549,09)

DP: Desvio padrão

Figura 8 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas diferentes conexões dos grupos experimentais.



5.1 Resultados intergrupos experimentais

Diferenças entre a quantificação bacteriana para o número de bactérias de *P. gingivalis* encontradas nas conexões dos grupos experimentais deste estudo, estão expressas nas Figuras 9, 10 e 11. Nota-se que em todos os tipos de conexões houve diferença significativa entre os dois agentes antimicrobianos (Proheal® e clorexidina) e o grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 9 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas conexões CM do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.

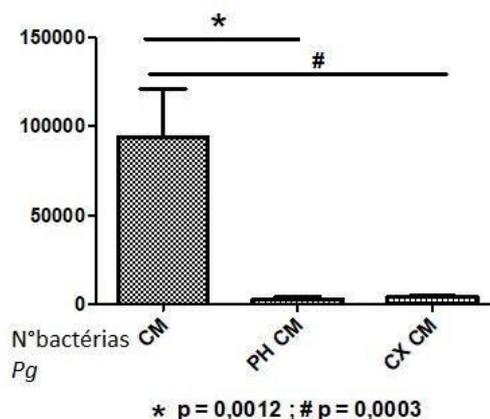


Figura 10 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas conexões HI do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.

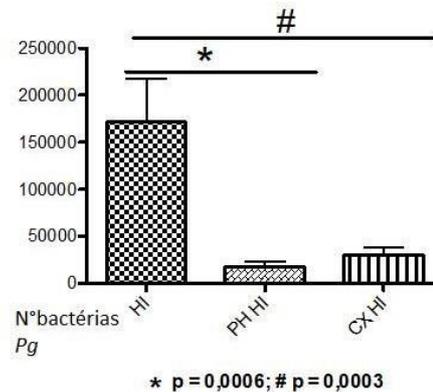
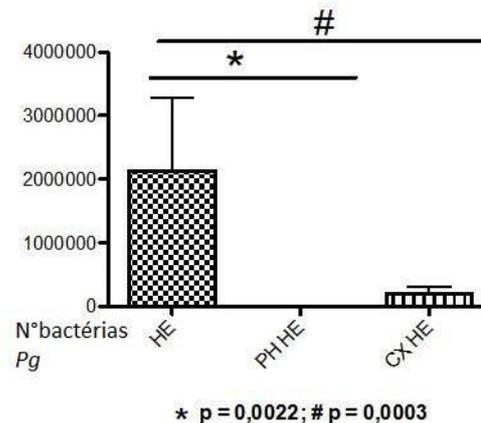


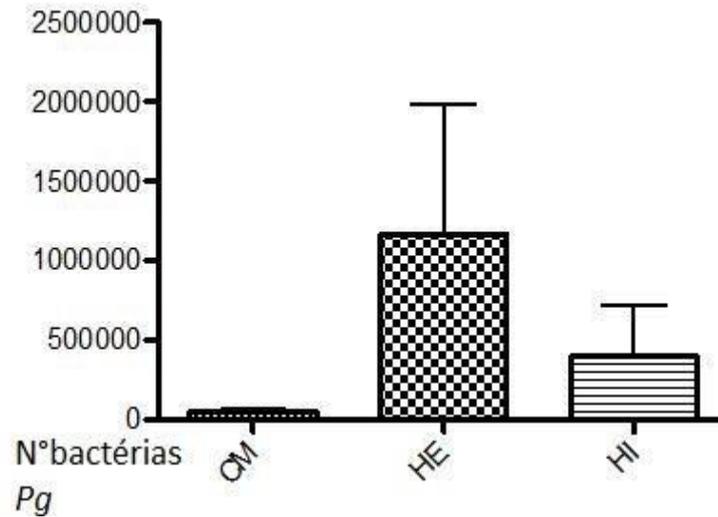
Figura 11 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas conexões HE do grupo controle, pomada Proheal® e clorexidina.



5.2 Resultados intragrupos de conexão

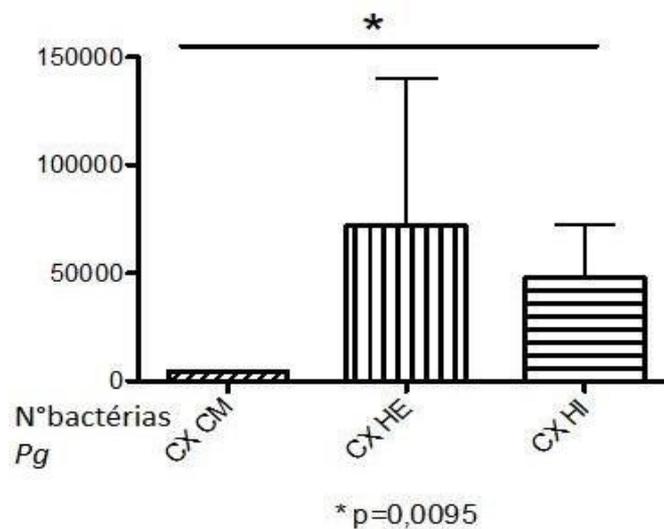
Os resultados referentes as avaliações dos tipos de conexão intragrupos (controle, CX e PH) estão expressas figuras 12, 13 e 14. Ao avaliar a atividade microbiana nos diferentes tipos de conexões pilar-implante foi observado no grupo controle a ausência de diferença entre os grupos CM, HE e HI (Figura 12). Em todos os grupos avaliados, foi possível observar um maior contingente bacteriano nas conexões do tipo HE.

Figura 12 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas diferentes conexões do grupo controle.



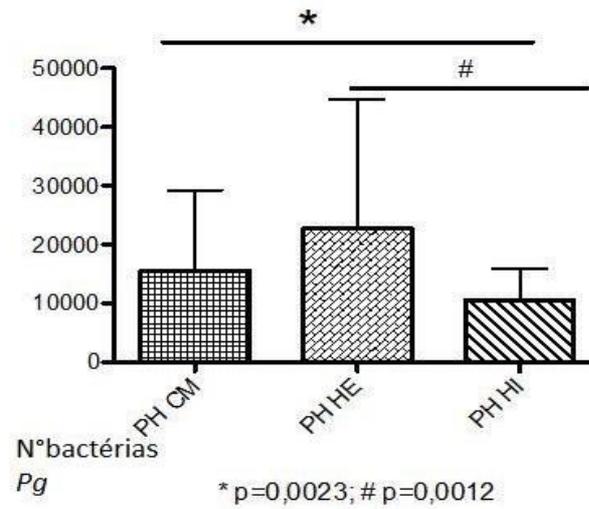
No grupo Clorexidina, a conexão do tipo CM apresentou o menor crescimento de cepas *P. gingivalis* ($p < 0,05$) quando comparado as conexões do tipo HI (Figura 13).

Figura 13 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas diferentes conexões do grupo clorexidina.



No grupo Proheal[®] houve diferença estatística entre todos os tipos de conexão: CM, HE e HI ($p < 0,05$), tendo o menor crescimento bacteriano para a conexão do tipo HI e maior crescimento em conexões do tipo HE (Figura 14).

Figura 14 - Quantificação bacteriana de *P. gingivalis* nas diferentes conexões do grupo Proheal[®].



6 DISCUSSÃO

A hipótese nula de que pomada Proheal[®] não possui atividade antimicrobiana na interface pilar-implante, foi descartada. Neste estudo, a atividade antimicrobiana da pomada Proheal[®] foi efetiva nos diferentes tipos de conexões pilar-implante.

Ao avaliar o crescimento bacteriano nos diferentes tipos de conexão observou-se que os implantes do tipo HE apresentaram o maior crescimento de cepas de *P. gingivalis* tanto no grupo controle quanto nos demais grupos testados. Isso ocorre porque há microfendas na junção pilar-implante deste tipo de implante fazendo com que haja proliferação bacteriana nesta região e criando uma espécie de reservatório bacteriano na interface implante/osso. Esta proliferação bacteriana está associada diretamente com a perda óssea e, conseqüentemente, com o sucesso dos implantes osteointegrados. Por isso, há algum tempo os pesquisadores vem se pensando em maneiras de diminuir a colonização bacteriana na superfície do implante (Sasada e Cochran, 2017).

Ao longo dos últimos tempos, os implantes têm apresentado várias evoluções ao nível do desenho, do material com que são fabricados e das suas características, especificamente as da superfície. Atualmente, são inúmeros os tipos de implantes em comercialização, com diferentes características físicas, mecânicas e químicas (Binon, 2000).

Inicialmente a interface implante-pilar constituía-se de um hexágono externo com uma altura de 0,7 mm, que serviu como um dispositivo de acoplamento de transferência de torque (acessório de montagem) durante a colocação inicial do implante no osso e a subsequente conexão da extensão transmucosa, que, ao serem realizados em sequência, poderiam restaurar um arco totalmente edentado (Beaty, 1994).

Contudo, foi necessário o uso de sistemas de conexões mais eficientes e com melhor desempenho mecânico e estético que os sistemas hexagonais. Uma das alternativas buscadas foi o sistema Cone Morse (Bozkaya e Müftü, 2003).

O sistema CM é caracterizado por um mecanismo de encaixe, onde dois elementos exercem uma ação resultante em contato íntimo por fricção, quando um elemento “macho” cônico é instalado numa “fêmea”, também cônica (Lorenzo, 2004).

As conexões CM tem sido propostas com objetivo de melhorar a estabilidade dos implantes. Com elas, há uma redução dos micromovimentos dos componentes, o que proporciona uma melhor vedação antibacteriana.

Neste estudo, observou-se que os implantes de conexão do tipo CM foram responsáveis pelo menor crescimento de *P. gingivalis* tanto no grupo controle, quanto nos grupos experimentais. Vários autores vêm apresentando resultados semelhantes a este (Koutouzis et al., 2011; Koutouzis et al., 2014; Tripodi et al., 2015; D'Ercole et al., 2014; Larrucea Verdugo et al. 2014).

Larrucea Verdugo et al. (2014) discutem que isso ocorre devido ao fato de que os implantes com conexões externas tendem a apresentar microfendas maiores do que os implantes com conexões do tipo Morse. Além disso, implantes com conexões externas apresentam uma área de vedação menor e paredes retas, o que exige um certo grau de tolerância entre as peças para unir o pilar.

No presente estudo, o número de bactérias de *P. gingivalis* no grupo CM controle foram inferiores inclusive ao número de bactérias encontradas no grupo CX HE. Foram encontrados valores absolutos médio de *P. gingivalis* no CM controle duas vezes menor que no CX HE.

Para além das limitações apresentadas pelas conexões do tipo HE, é necessário compreender que, embora a clorexidina seja um agente antimicrobiano amplamente utilizado na odontologia, ela também pode apresentar ressalvas.

Apesar de apresentar poucas desvantagens, a clorexidina apresenta efeito não seletivo e há relatos de reações alérgicas associadas a seu uso, especialmente quando encontradas em concentrações maiores ou iguais a 2% (Cai et al., 2018). Além disso, alguns estudos mostram que a clorexidina pode não conseguir reduzir de maneira tão eficaz a população bacteriana, especialmente *P. gingivalis*. (Cruz et al., 2012; Fekrazad et al., 2016).

Ademais, atualmente o uso da clorexidina na odontologia vem sendo discutido devido aos relatos de resistência bacteriana (Kampf, 2016). Pensando em criar alternativas à clorexidina, pesquisadores começaram a buscar antissépticos que apresentassem melhor propriedade antibiótica e mais estabilidade e durabilidade, principalmente quando em contato com fluidos orgânicos (Cruz, 1997). Nesse contexto surge a pomada Proheal®, a qual propõe o uso do iodofórmio como uma opção antisséptica para evitar a contaminação e conseqüentemente uma futura

reabsorção óssea ao redor do implante, com o mínimo dano aos tecidos peri-implantares (Silva-Junior et al., 2006).

O mecanismo de ação do iodofórmio deve-se a liberação lenta e persistente do iodo nos líquidos orgânicos. Age de modo letal em bactérias, alguns esporos, fungos e vírus através da inibição proteica. É praticamente insolúvel em água, o que faz com, que sua ação antisséptica seja débil, por outro lado, quando em contato com secreções ou áreas infectadas, a liberação do iodo nascente é constante, evitando possíveis contaminações posteriores. (Daniel et al., 1999; Carneiro et al., 2016).

Na odontologia, a utilização do iodofórmio é consolidada, especialmente na endodontia. A indicação do uso do iodofórmio está ligada ao tratamento de grandes lesões periapicais devido ao fato de agir como um estimulante biológico e pela sua capacidade antisséptica (Daniel et al., 1999; Dotto et al., 2006). Além disso, a sua propriedade radiopacificante permite a visualização e acompanhamento do preenchimento do canal radicular, grau de penetração da medicação, assim como é possível observar extravasamento das substâncias nos tecidos periapicais (Daniel et al. 1999).

Na implantodontia, acredita-se que a pomada de iodofórmio pode agir como um método físico de redução da contaminação bacteriana entre a interface implante / pilar e dentro do implante. Isso ocorre devido ao fato da pasta apresentar função de preencher os espaços vazios, vedar à penetração de microorganismos e controlar quimicamente a multiplicação microbiana no ambiente intrainplante e intercomponentes pela sua ação antisséptica (Carneiro et al., 2016).

Pereira et al. (2017) em um estudo *in vitro* objetivaram avaliar a eficiência antibacteriana entre géis com diferentes concentrações de clorexidina e tetraciclina (a 1%, 2% e 2,5%), e pomadas Neosporin® e ProHeal®. As cepas bacterianas utilizadas neste estudo incluíram: *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguinis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella nigrescens*. Segundo os autores, todos os agentes antibacterianos utilizados no interior dos implantes induziram zonas de inibição bacteriana contra bactérias aeróbicas, entretanto, a pomada ProHeal®, apresentou maior efeito antibacteriano contra bactérias do complexo vermelho anaeróbio, que residem interior de implantes e bolsas peri-implantes.

É importante salientar que apesar dos promissores resultados apresentados pela pomada ProHeal® em relação ao crescimento bacteriano de *P. gingivalis* no presente estudo, trata-se de um estudo *in vitro*, o qual apresenta limitações inerentes

a este tipo de estudo, desse modo, não reproduz fidedignamente a complexidade das funções fisiopatológicas existentes *in vivo*.

Estudos apontam que a *Porphyromonas gingivalis* tem um papel proeminente na orquestração da construção e virulência do biofilme e, conseqüentemente, na resposta imunológica apresentada pelos pacientes (Cai et al., 2018). Através de mecanismos biológicos, esta bactéria é capaz de sobreviver e se multiplicar na célula do hospedeiro, estimulando a perpetuação de nichos de replicação e conseqüentemente, suprimindo a apoptose (Mysak et al., 2014).

No entanto, a perda óssea peri-implantar não está exclusivamente ligada à presença de bactérias periodontopatogênicas. Fatores locais e sistêmicos também contribuem para o sucesso ou insucesso da osseointegração.

7 CONCLUSÃO

Este estudo confirmou a eficácia antimicrobiana da pomada Proheal® quando acondicionada nos diferentes tipos de conexões pilar- implante testados. A pomada Proheal® apresentou resultados antimicrobianos similares ao da clorexidina, no controle do crescimento bacteriano na superfície das interfaces pilar-implante avaliadas.

REFERÊNCIAS

1. Assenza B, Tripodi D, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G, D'Ercole S. Bacterial Leakage in Implants with Different Implant-Abutment Connections: An In Vitro Study. **Journal of Periodontology**. v. 83, n. 4, 491-497, abr. 2012.
2. Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernández AJ, Penarrocha-Oltra D, Balauguer-Martinez JF, Penarrocha MA. Peri-implantitis: associate microbiota and treatment. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 16, n.7, 937-943, Nov. 2011.
3. Beaty K, Binon P, Sutter F. et al. The role of screws in implant systems. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.9, sn, p. 48-63, Nov. 1994.
4. Binon P. Implants and components: entering the new millennium. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.15, n.1, p.76-94, Jan.-Fev. 2000.
5. Bonan RF, Batista AUD, Hussne RP. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 15, n. 2, p. 237-244. Abr-Mai., 2011.
6. Bozkaya D, Müftü S. Mechanics of the tapered interface fit in dental implants. **Journal of Biomechanics**. v. 36, n. 11, p.1649-58, Nov. 2003.
7. Brogгинi N., McManus L.M., Hermann J.S., Medina R.U., Oates T.W., Schenk R.K., Buser D., Mellonig J.T., Cochran D.L. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. **Journal of Dental Research**. v. 82, n. 3, p. 232-7, Mar. 2003.
8. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, Lei L, Huang X. Disinfect *Porphyromonas gingivalis* Biofilm on Titanium Surface with Combined Application of Chlorhexidine and Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v. 94, n. 5, p. 1-7, Nov. 2018.
9. Callan DP, O'Mahony A, Cobb CM. Loss of crestal bone around dental implants: a retrospective study. **Implant Dentistry**. v. 7, n. 4, p. 258-266, Jun. 1998.
10. Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Soldini C et al. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: crosssectional study

- after 5 years of functional loading. **Clinical Oral Implant Research**. v. 26, n. 4, p. 426-434, Abr. 2014.
11. 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. **Clinical Oral Implants Research**. v. 20, n. 4, p. 653-64, Ago. 2018.
 12. Carinci F, Lauritano D, Cura F et al. Prevention of bacterial leakage at implant-abutment connection level: an in vitro study of the efficacy of three different implant systems. **Journal of Biological Regulators. & Homeostatic Agents**. v. 30, Supl. 1, p. 69-73, Abr.-Jun. 2016.
 13. Carneiro CAL, Wassal T, Cruz F, et al. Efficacy of a cementing and antiseptic agent in preventing contamination and bacterial flow at the dental implant connection. **INPerio**. v. 1, n.3, p. 504-10, Mai. 2016.
 14. Costa GN, Martinez EF, Ruellas AMO, Peruzzo DC, Joly JC, Napimoga MH. Microbiological Sealing Analysis of a Tapered Connection and External Hexagon System. **International Journal of Dentistry**. v. 2017, n. 3849085, p. 1-4, Fev. 2017.
 15. Cruz M, Castro JMA. An antiseptic pomade comprised of iodoform for the control of microbial contamination of the inner ambient of dental implants: a randomized clinical trial. **International Journal of Oral Science**. v. 10, n.1, p. 1-7, mar. 1997
 16. Cruz M, Castro JMA. Effectiveness of Iodoform Antiseptic Pomade in the Control of Bacterial Dental Implant-Abutment Interface Contamination: A Randomized Clinical Trial. **International Journal of Oral Science**. v.14, n. 1, p. 1-14, Abr. 2001.
 17. Cruz M. Long-Term Assay of Iodoform Pomade in the Bacterial Control of the Inner Ambient of Dental Implants: A Randomized Clinical Trial. **International Journal of Oral Science**. v.15, n. 1, p.1-13, Fev. 2002.
 18. Cruz LMM, Nascimento AGS, DaSilva LE et al. Evaluation of cytotoxicity in chlorhexidine solutions concentrations of 2,5% to 5%. **International Journal of Science Dentistry**. v. 2, n. 38, p. 23-28. Ago. 2012.
 19. Cruz F, Leite F, Cruz G et al. Sutures coated with antiseptic pomade to prevent bacterial colonization: a randomized clinical trial. **Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 116, n. 2, p. e103-e109. Ago. 2013.
 20. Daniel RLDP, Jaeger MMM, Machado MEL. Emprego do iodofórmio em

- Endodontia: revisão da literatura. **Revista de Pós Graduação da FOU SP**. v.6, n. 2, p. 175-179, Abr./Jun. 1999.
21. D'Ercole S, Scarano A, Perrotti V et al. Implants with Internal and Conical Implant-Abutment Connections: An In Vitro Study of the Bacterial Contamination. **Journal of Oral Implantology**. v. 40, n. 1, p. 31-35, Fev. 2014.
 22. D'Ercole S, Tripodi D, Ravera L et al. Bacterial Leakage in Cone Internal Connection Implants Using Different Torque Values: An In Vitro Study. **Implant Dentistry**. v. 23, n. 2, p. 175-179, Abr. 2014.
 23. Do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V et al. Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. **Clinical Oral Implants Research**. v. 23, n. 10, p. 1168-1172, Out. 2011.
 24. Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Evaluation Of The Antimicrobial Action Of Different Medications Used In Endodontics. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.
 25. Duarte ARC, Rossetti PHO, Rossetti LMN et al. In Vitro Sealing Ability of Two Materials at Five Different Implant-Abutment Surfaces. **Journal of Periodontology**. v. 77, n. 11, p. 1828-1832, Nov. 2006.
 26. El Haddad E, Gianni AB, Mancini GE, et al. Implant-abutment leaking of Replace conical connection Nobel Biocare® Implant System: An *in vitro* study of the microbiological penetration from external environment of implant- abutment space. **Oral Implantology**. v.9, n. 2, p. 76-82, Abr.-Jun. 2016.
 27. Fekrazad R, Karamifar K, Bahador A. Comparison of antibacterial effect of photodynamic therapy using indocyanine green (Emundo) with 2% metronidazole and 2% chlorhexidine gel on *Porphyromonas gingivalis* (an in- vitro study). **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 15, n. 1, p. 28- 33, Set. 2016.
 28. Gherlone EF, Capparé P, Pasciuta R, Grusovin MG, Mancini N, Burioni R. Evaluation of Resistance Against Bacterial Microleakage of a New Conical Implant-Abutment Connection Versus Conventional Connections: An In Vitro Study. **New Microbiologica**. v. 39, n. 1, p. 49-56, Jan. 2016.
 29. Hortense SR, Carvalho ES, Carvalho FS et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v. 22, n. 2, p. 178-184, Mai.-Ago. 2010.
 30. Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, et al. Antibacterial activity of medicinal plant

- extracts against periodontopathic bacteria. **Phytotherapy Research**. v. 17, n. 6, p. 599-604, Jun. 2003.
31. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? **Journal of Hospital Infection**. v. 94, n.3, p. 213-227, Nov. 2016.
 32. Kluk E, Reinhold FCBC, Pereira N, Mello AMD, Mello FAZ. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista de Gestão em Sistemas de Saúde**. v. 14, n. 1, p. 7-13, Jun. 2016.
 33. Koutouzis T, Mesia R, Calderon N et al. The Effect of Dynamic Loading on Bacterial Colonization of the Dental Implant Fixture-Abutment Interface: An In Vitro Study. **Journal of Oral Implantology**. v. 11, n. 4, p. 432-437. 2014.
 34. Koutouzis T, Wallet S, Calderon N, Lundgren T. Bacterial Colonization of the Implant-Abutment Interface Using an In Vitro Dynamic Loading Model. **Journal of Periodontology**. v. 82, n. 4, p. 613-617, abr. 2011.
 35. Larrucea Verdugo C, Jaramillo Núñez G, Acevedo Avila A et al. Microleakage of the prosthetic abutment/implant interface with internal and external connection: in vitro study. **Clinical Oral Implants Research**. v. 25, n. 9, p. 1078-83, Set. 2014.
 36. Lee JH, Frias V, Lee KW et al. Effect of implant size and shape on implant success rates: a literature review. **Journal of Prosthetic Dentistry**. v. 94, n. 4, p. 377-81, Out. 2005.
 37. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. **Clinical Oral Implants Research**. v. 10, n. 5, p.339-45, Out. 1999.
 38. Lorenzo JL, Cavenague M. Microbiologia perimplantar. Microbiologia para estudante de Odontologia. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2004.
 39. Mancini GE, Gianni AB, Cura F, Ormanier Z, Carinci F. Efficacy of a new implant-abutment connection to minimize microbial contamination: an in vitro study. **Oral & Implantology**. v. 9, n. 3, p. 99-105, Jul.-Set. 2016.
 40. Mencio F, de Angelis F, Papi P et al. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 21, n. 7, p. 1443-1451, Abr. 2017.
 41. Misch CE. Implant design considerations for the posterior regions of the mouth. **Implant Dentistry**. v. 8, n. 4, p. 376-86, Fev. 1999.
 42. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the Different Implant

- Abutment Interface: A Systematic Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research.**, v. 11, n. 6, p. ZE10-ZE15, Jun. 2017.
43. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. **Journal of Immunology Research.** v. 2014, sn, p. 1-8, Mar. 2014.
 44. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R et al. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods.** v. 59, n. 1, p. 117-125, Out. 2004.
 45. Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR et al. Influence of implant surfaces on osseointegration. **Brazilian Dental Journal.** v. 21, n. 6, p. 471-81, Nov. 2010.
 46. Olsen I, Progulske-Fox A. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. **Journal of Oral Microbiology.** v. 7, n. 28788, p. 1-9, Ago. 2015.
 47. Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S et al. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. **Journal of Periodontology.** v. 79, n. 8, p. 1419-1425, Ago. 2008.
 48. Pereira LM, Carneiro TAPN, Davi LR et al. Microbiological Effectiveness of Anti-Bacterial Agents Used Inside Implants. **Journal of Dentistry & Oral Disorders.** v. 3, n. 3, p. 1-4, Jun. 2017.
 49. Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M et al. Fluids and Microbial Penetration in the Internal Part of Cemented-Retained Versus Screw-Retained Implant-Abutment Connections. **Journal of Periodontology.** v. 72, n. 9, p. 1146-1150, Set. 2001.
 50. Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MGJ, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. **Clinical Oral Implants Research.** v.17, n. 6, p. 633–637, Dez. 2006.
 51. Pucci FM. Conductos radiculares: anatomia, patologia y terapia. 1 ed. Montevidéo: Médico Quirugia; 1945.
 52. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology.** v.98, n. 4, p. 488-92, Out. 2004.
 53. Saggar V, Chandra S, Jaiswal JN, Singh M. Antimicrobial efficacy of iodoforimized zinc oxide eugenol sealer on microorganisms of root canal. **Journal**

- of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry.** v. 9, n. 1, p. 1-3, Mar. 1996.
54. Sasada Y, Cochran DL. Implant-abutment connections: a review of biologic consequences and peri-implantitis implications. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.** v. 32, n. 6, p. 1296-1307, Nov-Dez., 2017.
 55. Schmitt CM, Nogueira-Filho G, Tenenbaum HC, et al. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research.** v. 102, n. 2, p. 552-574, Fev. 2014.
 56. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, et al. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. **BioMed Research International.** v. 2016, n. 2, p. 1-16, Jan. 2016.
 57. Tesmer M, Wallet S, Koutouzis T et al. Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study. **Journal of Periodontology,** v. 80, n. 12, p.1991-1997, Dez., 2009.
 58. Tettamanti L, Andrisani C, Andreasi Bassi M et al. Post Extractive Implant: Evaluation Of The Critical Aspects. **Oral & Implantology,** v. 10, n. 2, p. 119-128, Abr.-Jun. 2017.
 59. Tripodi D, D'Ercole S, Iaculli F, Piattelli A, Iezzi G. Degree of Bacterial Microleakage at the Implant-Abutment Junction in Cone Morse Tapered Implants Under Loaded and Unloaded Conditions. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials.** v. 13, n. 4, p. e367-e371, Dez. 2015.
 60. Van Assche N, Pittayapat P, Jacobs R et al. Microbiological outcome of two screw-shaped titanium implant systems placed following a split-mouth randomized protocol, at the 12th year of follow up after loading. **European Journal of Oral Implantology.** v. 4, n. 2, p. 103-116, Jun.-Jul. 2011.
 61. Zanatta FB, Rosing CK. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A.** v. 1, n. 2, p. 35-43, Out. 2007.
 62. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.** v. 74, n. 1, p. 49-58, Jul. 2005.