

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

ANA LUIZA PINHEIRO TANNURE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA
INTERFACE IMPLANTE/PILAR PROTÉTICO COM CONEXÃO
CÔNICA**

**São Paulo
2007**

ANA LUIZA PINHEIRO TANNURE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA
INTERFACE IMPLANTE/PILAR PROTÉTICO COM CONEXÃO
CÔNICA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Implantodontia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro, sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo.

**São Paulo
2007**

Patri nº 5857
Tipo entrada DOAÇÃO
Nota Fiscal
Data rec. 23.11.2008
Preço
Origem
.....

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I

T173a Tannure, Ana Luiza Pinheiro
Avaliação *in vitro* da infiltração bacteriana na interface implante/pilar protética com conexão cônica / Ana Luiza Pinheiro Tannure. Orientação do Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo. – São Paulo: 2007.
75 p.

Dissertação (Mestrado). Área de concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

1. Implantes Dentários. 2. Infiltração. 3. Bactérias. I. Título. II. De Lorenzo, José Luiz.

Autorizo a impressão parcial do meu trabalho acadêmico para fins de divulgação científica.

São Paulo, ____ de _____ de 200__.

Nome e Assinatura

ANA LUIZA PINHEIRO TANNURE

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA INTERFACE
IMPLANTE/PILAR PROTÉTICO COM CONEXÃO CÔNICA**

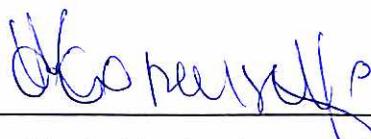
Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro. Área de concentração em Implantodontia.

Data de Aprovação: 26, 11, 2007.

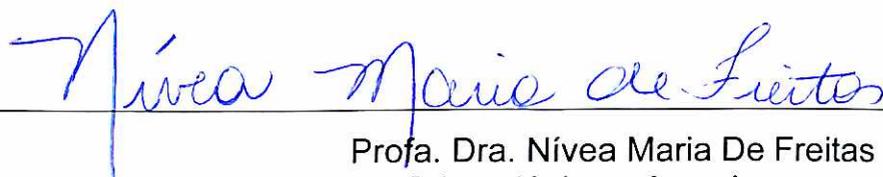
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo (orientador)
Doutor em Ciências, área de concentração Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato
Doutora em Ciências, área de concentração Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Nívea Maria De Freitas
Doutora em Ciências Odontológicas, área de concentração Periodontia
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

CONCEITO FINAL: _____

A **Deus**, pela presença constante, pelas oportunidades e pela força interior que me impulsiona a seguir na busca dos meus sonhos.

Ao meu filho **Mathiello** pelo amor, carinho e felicidade de tê-lo, razão maior de minha motivação na busca de novos horizontes na minha profissão.

À minha mãe **Luiza**,
pela compreensão nos meus momentos mais difíceis,
pelo amor incondicional,
pelas palavras que me impulsionam na hora certa,
pela fibra e coragem na condução de nossas vidas.
Obrigada por ser tão especial, por me ouvir e apoiar sempre.

Ao meu querido e inesquecível pai **Kalil**, pela grande figura humana que foi e pelo exemplo de honestidade e honradez.

Aos meus irmãos **Lígia e Cristiano** pela amizade e incentivo no meu crescimento profissional.

A toda minha **família** pelo apoio constante em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Ms. Carlos Manoel de Oliveira Nascimento** pela primorosa orientação, amizade e inestimável disponibilidade na execução da parte experimental desta pesquisa no Laboratório de Microbiologia da UNISA, minha eterna gratidão.

Ao **Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo**, meu orientador, pelo elevado nível científico demonstrado, pelos ensinamentos e orientação habilidosa, dando a segurança necessária ao desenvolvimento desta pesquisa, com dedicação, paciência e amizade. Meu agradecimento pelo docente brilhante e pela pessoa humana que é.

Ao **Prof. Dr. Alfredo Gonçalves Cunha**, Coordenador do Laboratório de Plasma Térmico do Departamento de Física da UFES, pela competência e elevado espírito científico e humano, abrindo as portas do Laboratório, orientando na metodologia para execução da microscopia eletrônica de varredura e na leitura dos resultados da nossa pesquisa.

Ao **Carlos Irapuan Lube de Menezes** pelo profundo conhecimento no manejo do microscópio eletrônico de varredura nas incontáveis horas dedicadas o que representou um valor inestimável para conclusão desta pesquisa, a minha sincera gratidão.

Ao **Prof. Dr. Silas da Cunha Ribeiro**, pela confiança em mim depositada, pela sua orientação nos anos em que estive na USP, o que muito me motivou na busca pelo saber. Obrigada pelo brilhantismo como docente que muito contribuiu para o que sou hoje.

Ao **Prof. Ms. Ricardo Luiz Carvalho Gottardi**, pela primorosa orientação enquanto estudante, estagiária e profissional, que sempre me impulsionou a buscar o que há de melhor na Odontologia, obrigada pela contribuição e incentivo para o meu crescimento.

Ao **Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk**, Coordenador do Curso de Mestrado em Implantodontia da UNISA, pela forma competente com que conduz a Pós-graduação, nos proporcionando um curso de alto nível.

Ao amigo, **Sr. Marcus Barros**, pela habilidade e dedicação na confecção e adaptação de instrumentos para a nossa pesquisa e pelo auxílio nas fotografias utilizadas, meu sincero reconhecimento.

Ao **Fabício** pela colaboração no uso da microscopia eletrônica de varredura, o meu reconhecimento.

Às estagiárias de Microbiologia da UNISA, **Daniele Gomes Lima e Dayane Cristina Ribeiro**, pela colaboração e amizade na execução desta pesquisa.

À **Universidade de Santo Amaro**, pela permissão para a utilização do Laboratório de Microbiologia.

À **Universidade Federal do Espírito Santo**, Departamento de Física, Laboratório de Plasma Térmico na pessoa de Alfredo Gonçalves Cunha, pela permissão para utilização do Laboratório, agradeço também.

Ao **Fernando**, do Setor de Esterilização da Faculdade de Odontologia da UNISA, pela disponibilidade e colaboração, ao **Renato** funcionário da Biblioteca pelo auxílio no levantamento da literatura e à **Juliana**, secretária da Pós-graduação, pela atenção durante o curso.

À amiga **Madiana**, pela receptividade e amizade durante todo o tempo que estive em São Paulo para o Curso de Pós-graduação, tendo um valor inestimável para a realização deste curso. A minha sincera gratidão e o meu apreço.

À minha sobrinha **Flávia Tannure Dadalto**, pela colaboração na orientação dos recursos de informática utilizados neste trabalho.

Aos meus sobrinhos **Regina Tannure Rambalducci** e **Christian Tannure Rambalducci** pela colaboração na tradução do resumo deste trabalho para o inglês.

Ao meu colega de mestrado, consultor científico da Empresa Titanium Fix®, **Marcelo Gallo Oliani**, pela confiança e apoio irrestrito.

Ao meu amigo **Odair Borghi**, que com a sua experiência e disponibilidade trouxe inestimáveis contribuições ao meu aprimoramento profissional. A minha gratidão pelo apoio e amizade.

Aos meus **colegas de Mestrado** que no convívio diário promoveram momentos de descontração favorecendo um bom rendimento na execução do trabalho. Obrigada pelo convívio e pela amizade construída nestes anos.

Às Empresas **Conexão®** e **Titanium Fix®** pela doação dos materiais necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

A infiltração de fluidos orgânicos e de bactérias na interface implante/pilar protético é responsabilizada pela ocorrência de mau odor e, provavelmente, por inflamação nos tecidos perimplantares. O propósito deste trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade do conjunto implante/pilar protético de dois sistemas de conexão cônica fabricados no Brasil (Conexão[®] e Titanium Fix[®]) de impedir o trânsito bidirecional de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis*, assim como mensurar o microvalamento presente nos dois sistemas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e analisar pela MEV a configuração interna dos conjuntos de ambas as marcas. Para avaliar a infiltração do microvalamento interno para caldos *Brain Heart Infusion* (BHI), foi feita a inoculação de 0,3 μ l de uma mistura dessas bactérias na parte interna de dez implantes de cada marca, seguida da adaptação do seu pilar protético com o torque recomendado pelos fabricantes; os conjuntos foram imersos no BHI e após 48 horas de incubação foi verificado se houve turvação do caldo. Neste teste foi constatada a infiltração em nove dos dez implantes da marca Conexão e em quatro dos nove da marca Titanium Fix, pois um destes foi descartado por ter sido contaminado externamente no momento da inoculação da suspensão bacteriana. A infiltração de fora para dentro foi testada em outros dez conjuntos de cada marca, montados da mesma forma que os anteriores e colocados em BHI contendo a mistura de bactérias; após incubação durante 48 horas, os conjuntos foram separados, 5 μ l de solução fisiológica estéril foram inseridos no interior de cada implante e o material do seu interior coletado com pontas de papel absorvente estéril e semeado em Ágar BHI para verificar o desenvolvimento de colônias das bactérias-teste. Nesse teste os 20 conjuntos das duas marcas avaliadas apresentaram alto grau de infiltração. Os microvalamentos implante/pilar dos conjuntos testados mostraram dimensões bastante variáveis, em média 3,42 μ m nos da marca Conexão[®] e 3,59 μ m nos da marca Titanium Fix[®], mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. A análise da configuração interna dos conjuntos contribuiu para esclarecer a razão da diferença na infiltração observada nas duas marcas.

Palavras-chave: Implantes dentários. Infiltração. Bactérias.

ABSTRACT

The infiltration of organic fluids and bacteria in the prosthetic interface implant/pillar are responsible for halitosis and most likely the inflammation on the peri-implant tissue. The purpose of this investigation was to evaluate in vitro the capacity of the implant/pillar prosthetic compound of two systems of conic connection produced in Brazil (Conexão[®] and Titanium Fix[®]) of avoiding the bidirectional flow of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp and to measure through a scanning electron microscopy (SEM) the micro gap present on both systems, as well as to analyze through SEM the internal configuration of both brands. In order to evaluate the infiltration of the internal micro gap to the Brain Heart Infusion (BHI) solution we proceeded with the insertion of 0,3ml of a mixture of these bacteria on the inner part of ten implants from each brand followed by the adaptation of their prosthetic pillar with a torque recommended by the manufactures. Then the compounds were submerged in the BHI solution and after forty-eight hours, it was verified whether there had been any disturbance of the environment. This test confirmed the infiltration in nine out of ten implants from the Conexão[®] brand and in four out of nine from the Titanium Fix[®] brand because one compound was discarded since it was externally contaminated during the inoculation with the bacterial solution. The outwards-in bacterial infiltration was tested in ten other implant/pillar compounds from each brand built in the same way as the former and placed in BHI solution containing the bacterial mixture. After the forty-eight hours of incubation, the compounds were separated and 5ml of sterile physiological solution were inserted in the interior of each implant. Then the material from their interior was collected with sterile absorbing paper points and planted in Agar BHI to check for the possible development of colonies of the tested bacteria. Through this test it was proven that all of the twenty implants from both brands tested presented a high level of infiltration. The pillar/implant micro gaps of the compounds utilized in this experiment had varying dimensions of about 3,42mm on those from the Conexão[®] brand and 3,59mm on the ones from the Titanium Fix[®] brand; however, this difference was not statistically significant. The internal configuration analysis of the compounds done at the scanning electron microscopy (SEM) served to clarify the reason for the difference in infiltration present on both brands.

Key words: Dental implants. Infiltration. Bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Implantes com conexão cônica Titanium Fix [®] (à esquerda) e Conexão [®] (à direita), seus respectivos pilares protéticos e os conjuntos conectados	31
Figura 2 -	Torquímetro Conexão [®] , chaves quadradas Titanium Fix [®] e Conexão [®] (da esquerda para a direita) e extensor da chave quadrada Conexão [®] (terceira da esquerda para a direita). Visão de topo das chaves e extensor, no detalhe.....	32
Figura 3 -	Micropipeta e microponteira utilizadas; o detalhe mostra a calibração para 0,3µl	35
Figura 4 -	Inserção do inóculo bacteriano no interior do implante	35
Figura 5 -	Torque de 20 Ncm sendo dado num conjunto da Conexão [®]	36
Figura 6	Verificação de contaminação externa com uma ponta de papel absorvente	37
Figura 7 -	Semeadura das pontas de papel que foram passadas na interface em BHIA, para verificação da contaminação externa.	38
Figura 8 -	Conjuntos implante/pilar imersos em BHI estéreis	39
Figura 9 -	Conexão manual inicial do pilar ao implante	41
Figura 10 -	Conjuntos implante/pilar imersos no caldo de cultura contaminado	42
Figura 11 -	Conjuntos removidos do caldo BHI contaminado e colocados sobre gazes esterilizadas, para absorção inicial	43
Figura 12 -	Destorque dos pilares com chave confeccionada de acordo com a forma da extremidade do pilar. Visão em detalhe da ponta da chave	44
Figura 13 -	Coleta do conteúdo do oco do implante com ponta de papel absorvente estéril.....	44
Figura 14 -	Microscopia eletrônica de varredura: visão geral do conjunto Conexão [®]	47
Figura 15 -	Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 270 vezes no local a ser medido	47
Figura 16 -	Microscopia eletrônica de varredura: tomada em 30 ^o do conjunto da Titanium Fix [®] com um aumento de 20 vezes	48
Figura 17 -	Microscopia eletrônica de varredura: tomada de cima do conjunto da Titanium Fix [®]	48
Figura 18 -	Microscopia eletrônica de varredura: visão aproximada do conjunto Titanium Fix [®]	49
Figura 19 -	Microscopia eletrônica de varredura: detalhe do conjunto Titanium Fix [®]	49
Figura 20 -	Configuração interna do conjunto da Conexão [®] incluído no bloco de resina	50
Figura 21 -	Configuração interna do conjunto da Titanium Fix [®] incluído no bloco de resina	51
Figura 22 -	Turvação do caldo BHI em que foi semeado o conjunto 3T da Titanium Fix [®]	52
Figura 23 -	Desenvolvimento bacteriano, em BHIA, observado nas pontas coletoras de material do interior oco dos implantes.....	53

Figura 24 -	Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 70 vezes em um dos pontos a serem medidos, em 90 ^o	55
Figura 25 -	Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 350 vezes em um dos pontos a serem medidos	55
Figura 26 -	Microscopia eletrônica de varredura: região em 90 ^o do lado oposto	56
Figura 27 -	Microscopia eletrônica de varredura: aproximação máxima (aumento de 5.000 vezes) utilizada em um dos pontos a serem medidos	56
Figura 28 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista e dimensões da parte final do oco do implante da Conexão [®]	59
Figura 29 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida da extensão do parafuso da Conexão [®] que penetra no oco do implante	59
Figura 30 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida da parte final do oco do implante da Titanium Fix [®]	60
Figura 31 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista da extensão do parafuso do conjunto Titanium Fix [®] que penetra no oco do implante	60
Figura 32 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista da área de compressão com medições de espaços internos	61
Figura 33 -	Microscopia eletrônica de varredura: detalhe da compressão do passo de rosca sobre a parte superior	61
Figura 34 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista e medidas dos espaços internos do conjunto Titanium Fix [®]	62
Figura 35 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida dos espaços internos do conjunto da Conexão [®]	62
Figura 36 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista em 30 ^o do oco do conjunto Titanium Fix [®]	63
Figura 37 -	Microscopia eletrônica de varredura: vista em 30 ^o do oco do conjunto da Conexão [®]	63

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 -	Características gerais dos componentes dos implantes testados e os torques recomendados para sua conexão.....	34
Tabela 2 -	Positividades dos testes de infiltração bacteriana no micro- espaço de 20 implantes de conexão cônica das marcas Conexão® e Titanium Fix® fabricadas no Brasil	54
Tabela 3 -	Resultado da medida das interfaces implante/pilar com conexão cônica das marcas Conexão® e Titanium Fix® no microscópio eletrônico de varredura, em quatro locais de cada conjunto (A, B, C e D) com as respectivas médias	57
Tabela 4 -	Análise estatística das dimensões dos microvalamentos dos dois sistemas testados – Teste t	57
Gráfico 1 -	Demonstração da média dos valores, em μm , dos microvalamentos dos dois sistemas testados	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

atm	-	Atmosfera
BHI	-	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHIA	-	<i>Ágar Brain Heart Infusion</i>
°C	-	Grau Celsius
mm	-	Milímetro
μ	-	Mícron
μm	-	Micrometro
μl	-	Microlitro
N	-	Newton
Ncm	-	Newton por centímetro
TSB	-	<i>Tryptic Soy Broth</i>
MEV	-	Microscópio eletrônico de varredura
Nm	-	Nanometro
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Estudos <i>in vitro</i> sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de outros sistemas de conexão de implantes dentários	16
2.2 Estudos <i>in vivo</i> sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de outros sistemas de conexão de implantes dentários	22
2.3 Estudos <i>in vitro</i> sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de implantes dentários com sistema de conexão cônica	28
2.4 Estudos para mensurar os microvalamentos de implantes dentários com sistema de conexão cônica	29
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Cuidados gerais de assepsia	32
4.2 Testes microbiológicos preliminares.....	33
4.3 Análise da infiltração bacteriana da interface implante/pilar para o meio externo.....	34
4.4 Análise da infiltração bacteriana do meio externo para a interface implante/pilar	41
4.5 Análise da medida do microvalamento interno em microscópio eletrônico de varredura	45
4.6 Análise da configuração interna dos conjuntos implante/pilar.....	50
4.7 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Análise da infiltração bacteriana da interface implante/pilar para o meio externo	52
5.2 Análise da infiltração bacteriana do meio externo para a interface implante/pilar	53
5.3 Análise da medida do microvalamento interno em microscópio eletrônico de varredura	54
5.4 Análise da configuração interna dos conjuntos no microscópio eletrônico de varredura	58
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do biofilme perimplantar é associado a deficiências na higiene bucal e tem mostrado uma direta relação com o risco de insucesso em Implantodontia. Em sítios afetados por perimplantite severa é detectada uma complexa microbiota contendo altas proporções relativas de patógenos periodontais convencionais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Micromonas micros* e *Campylobacter rectus* e, em casos refratários ao tratamento, alguns microrganismos superinfectantes exógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, ou de baixa frequência na boca como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (DE LORENZO; SIMIONATTO; DE LORENZO, 1997; DE LORENZO e CAVENAGUE, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* processados na década de 1990 começaram a demonstrar a infiltração de fluido e de bactérias do biofilme perimplantar na união implante-pilar do sistema Branemark® (PERSSON et al., 1996; QUIRYNEN et al., 1994; QUIRYNEN; VAN STEENBERGHE, 1993; TRAVERSY; BIREK, 1992) e que essa ocorrência é a responsável por mau odor e, possivelmente, por mucosite perimplantar e perimplantite (MCARTHY; GUCKES, 1993; STEFLIK et al., 1991). As bactérias que colonizam a superfície externa do implante são mais acessíveis aos mecanismos de defesas do hospedeiro do que as que contaminam as superfícies internas (microvalamentos, ocos dos parafusos etc.), razão pela qual elas podem persistir por períodos extensos de tempos e criar um meio ambiente condutivo para infecções perimplantares recorrentes (LISGARTEN, 1999).

Os vários sistemas de implantes dentais osseointegrados podem ser classificados dentro de duas amplas categorias: submersos (dois estágios) e não submersos (um estágio). O submerso necessita a colocação da porção coronária do implante no nível da crista alveolar ou abaixo dela. O não-submerso requer a colocação do topo do implante acima do nível dessa crista. Nesse sistema, a interface implante/pilar não está localizada no nível da crista óssea porque o implante emerge do tecido gengival para a cavidade bucal (O'MAHONY; MACNEILL; COBB, 2000). Em alguns dos sistemas submersos, pode existir um microvalamento

no nível da crista alveolar onde se encaixam o pilar e o corpo do implante (DIBART et al., 2005), usualmente associado com aumento da inflamação e perda da crista óssea alveolar (BROGGINI et al., 2003).

Vários tipos de conexões do implante com o pilar protético têm sido sugeridos para a redução ou eliminação de microvalamentos que permitem a introdução de bactérias, mas muitos pesquisadores ainda têm relatado essa ocorrência, sobretudo em implantes com conexão em forma de hexágono externo.

Aparentemente, Jansen; Conrads e Richter (1997) e Dibart et al. (2005) foram os únicos pesquisadores que testaram se ocorre infiltração bacteriana na interface dos componentes do sistema de conexão cônica. Os primeiros constataram que essa penetração ocorre nos sistemas Astra[®], Ankylos[®] e Bonifit[®] e os segundos mostraram que não ocorre infiltração no sistema Bicon[®].

A necessidade de esclarecer esse impasse justifica a realização de novas pesquisas, como a que estamos apresentando.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A questão da ocorrência de infiltração de fluidos orgânicos e principalmente de bactérias entre os componentes dos implantes de dois estágios ganhou importância clínica a partir da publicação de dois trabalhos no início da década de 1990.

Em uma análise retrospectiva da perda de implantes de vários tipos, Stefflik et al. (1991) concluíram que uma das causas do insucesso de implantes dentários pode ser sua má adaptação com o pilar protético, visto que nesta área pode ocorrer desenvolvimento bacteriano e comprometimento dos tecidos perimplantares adjacentes.

McArthy e Guckes (1993) relataram que os portadores de pilares Estheticone angulados se queixavam de sabor e odor desagradáveis e relacionaram esse problema com a presença de resíduos orgânicos e de colonização bacteriana dentro do conduto de acesso do parafuso do pilar ou no espaço existente entre o pilar da prótese e o cilindro de ouro.

2.1 Estudos *in vitro* sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de outros sistemas de conexão de implantes dentários

Traversy e Birek (1992) relataram que ocorre infiltração bidirecional de fluidos e/ou penetração de *Streptococcus sanguis* (atualmente *S. sanguinis*) na interface implante/pilar do sistema Branemark®. Essa infiltração foi demonstrada pelo uso de uma solução padrão de paranitrofenol e de cultivo desse colonizador inicial encontrado em grande número tanto no biofilme dental como no perimplantar. A invasão dessa espécie bacteriana foi confirmada posteriormente por dois pesquisadores brasileiros. Cravinhos (2003) analisou a contaminação dessa bactéria na interface implante/pilar em 30 implantes de três sistemas comercializados no Brasil: Colosso®, Conect® e Globtek® (dois de hexágono interno e um de hexágono externo). Inoculou 0,1µl de uma solução contendo essa bactéria na superfície interna de cada implante e logo após o pilar protético foi adaptado e parafusado com um torque de 30Ncm. A composição implante/pilar protético foi, então, colocada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e levada a uma estufa bacteriológica por

14 dias, sendo que a cada 24 horas, era observado se havia turvação do meio. Todos os implantes apresentaram evidências de infiltração bacteriana, mas não foram observadas diferenças, estatisticamente significantes, entre os sistemas. O autor ainda concluiu dizendo que a troca de fluidos através dessa interface pode comprometer a estabilidade dos implantes a longo prazo. Amaral (2003) avaliou a contaminação dessa espécie bacteriana na interface implante/pilar protético, buscando correlacioná-la com as dimensões dos espaços da referida interface. Foram utilizadas 50 composições de implantes com seus respectivos pilares protéticos (Conic[®], Master Porous[®], Serson[®], INP[®] e Implac[®], todos com hexágono externo com exceção do Serson[®] que tem hexágono interno), divididos em grupos de dez unidades. A análise microbiológica foi realizada após a inoculação de *S. sanguinis* na parte interna do implante, seguida da adaptação de um pilar protético parafusado manualmente a um torque de 32N. A composição foi inserida em um caldo BHI que foi incubado em uma estufa bacteriológica durante 14 dias, sendo realizada uma leitura diária para verificação da contaminação. Passados os 14 dias, os implantes foram levados para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento variando de 30 a 2000x, para verificar os tamanhos dos espaços na interface implante/pilar protético. Os resultados foram submetidos ao teste de proporção no nível de significância de 5% para comparação do percentual de implantes contaminados e dos tamanhos dos espaços encontrados. Todos os grupos avaliados apresentaram alto grau de infiltração bacteriana na interface implante/pilar protético, com exceção dos implantes Serson[®], que apresentaram um resultado menor e estatisticamente significativo, em relação aos demais grupos. Com relação às dimensões dos espaços na interface implante/pilar protético, não houve correlação com a contaminação bacteriana observada nos sistemas de implantes estudados.

Outro pesquisador brasileiro (BARBOSA, 2006) avaliou a infiltração de *Streptococcus sobrinus* entre os componentes de 20 implantes da marca SIN[®] divididos em dois grupos de dez unidades, um analisado pela técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization* e, o outro, pelo método de cultivo. Em condições assépticas, foram inoculados 3µl de um cultivo dessa bactéria em caldo sacarose-bacitracina na rosca interna de cada implante, conectando-se o pilar protético com torque de 32Ncm. Os conjuntos foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 5,0 ml desse caldo de cultura e incubados durante 14 dias; a ocorrência de

turvação foi observada a cada 24 horas. Os microrganismos desenvolvidos foram analisados pelos dois métodos. Para comparação inicial entre as técnicas, os 20 implantes utilizados no experimento foram criteriosamente limpos, esterilizados, testados quanto à presença de DNA remanescente e divididos em dois grupos de dez unidades, um analisado pela técnica de *DNA-checkerboard* e, o outro, pelo método de cultivo. Seguindo o mesmo processo de assepsia do meio, foram inoculados 3µl da solução contendo *S.sobrinus* na rosca interna de cada implante. Logo em seguida, os microrganismos foram recuperados e analisados pelos dois métodos. Ao final do período de 14 dias, observou-se a turvação do meio de cultura em seis conjuntos implante/conectores. A frequência de contaminação dos conjuntos foi de 0,3. Houve redução significativa, tanto pelo método *DNA-checkerboard* como pelo método de cultura tradicional, em relação à contagem dos microrganismos provenientes do interior dos conjuntos implante/conectores após o período de imersão em caldo sacarose-bacitracina. Tanto no período inicial quanto após 14 dias, o *DNA-checkerboard* detectou maiores contagens de *S. sobrinus* em relação ao grupo analisado pela técnica de cultura ($p < 0,05$).

Quirynen et al. (1994) imergiram 32 conjuntos implante/pilar do sistema Branemark® em caldos de cultivo contendo sangue e bactérias isoladas do biofilme de pessoas com doenças periodontais, sendo 16 parcialmente imersos (para exame da infiltração na interface implante/pilar) e 16 completamente imersos (para se observar a infiltração em ambas as interfaces – implante/pilar e prótese/pilar). Após sete dias de incubação anaeróbica, os microorganismos da parte interna do implante foram coletados e incubados anaerobicamente em placas de ágar-sangue. Em ambos os casos foram encontrados bactérias, inclusive várias patogênicas, mas o número era bem menor nos parcialmente imersos.

Jansen; Conrads e Richter (1997) relataram a ocorrência de infiltração de *Escherichia coli* em 13 diferentes combinações implante/pilar geradas de nove sistemas de implantes (Astra®, Ankylos®, Bonifit® com pilar cônico, Bonifit® com pilar Octa, Branemark®, Calcitek®, Frialit-2®, Ha-Ti® com base de coroa, Ha-Ti® com poste telescópico, IMZ® com TIE®, IMZ® com IMC-Insert® e Semados®) em dez conjuntos de cada tipo. A interface dos três primeiros é cônica, do Ha-Ti® com base de coroa, é plana e cônica na parte interna, e a do restante é plana. Quando o Frialit-2® foi suprido com um anel de silicone, houve menos casos de infiltração. A largura do microvalamento marginal entre os componentes pré-fabricados medidos com MEV

foi menor que 10µm em todos os sistemas. Steinebrunner et al. (2005) avaliaram a infiltração dessa espécie bacteriana na interface implante-pilar, associada a um simulador mastigatório em dois eixos de carga. Os autores teorizaram que o carregamento dinâmico diminuiria a estabilidade das conexões de implante-pilar, conduzindo a penetração bacteriana através do microvalamento. Testaram cinco sistemas de implantes (Branemark® com hexágono externo; Frialit-2/Hermetics® com hexágono, haste guia e borracha de silicone integrados; Replace Select®, tubo a tubo com fixação provida de ressalto e fenda; Camlog®, tubo a tubo com fixação provida de ressalto e fenda; Screw-Vent®, hexágono interno com fixação por fricção) com oito combinações de pilar-implante padrões para coroas únicas de molar. A parte interna dos implantes foi inoculada com suspensão de *E. coli* e estes, conectados à supra-estrutura com o torque recomendado. Os espécimes foram imersos e incubados em uma solução nutriente e carregados com 1.200.000 ciclos de 120N no simulador mastigatório. Foram constatadas diferenças significantes entre os sistemas de implantes em relação ao número de ciclos mastigatórios necessários para que ocorresse a penetração bacteriana: 172.800 para Branemark®, 43.200 para Frialit-2/Hermetics®, 64.800 para Replace Select®, 345.600 para Camlog® e 24.300 para Screw-Vent®. Para os autores, o grau de penetração num sistema de implantes específico seria uma condição multifatorial dependente da precisão de ajuste entre o implante-pilar, o grau de micromovimentos entre os componentes e a força de torque usada para conectá-los. Demonstraram que esse teste pode ser uma ferramenta sensível para as empresas aperfeiçoarem seus implantes e componentes protéticos, visando prevenir a penetração bacteriana em condições de carregamento dinâmico. No Brasil, Cury et al. (2006) avaliaram a infiltração de *E. coli* na interface implante/intermediário protético, associando intermediários de diferentes fabricantes nacionais. O implante utilizado foi o Frialit-2® e a conexão testada foi o hexágono interno. A penetração do microrganismo foi detectada na parte interna dos implantes de todos os grupos, exceto o controle (conjunto estéril). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. O uso de intermediários protéticos de diferentes fabricantes não aumentou a infiltração.

Guindy et al. (1998) testaram a infiltração de *Staphylococcus aureus* em montagens completas de implantes Ha-Ti® (conexão com hexágono interno) incluindo suas coroas pré-fabricadas retidas a parafuso, através ou do

microvalamento marginal ou do espaço do parafuso transversal de fixação da coroa. Na primeira etapa do experimento, os espécimes foram colocados no interior de caldos *Tryptic Soy Broth* (TSB) contaminados com essa bactéria e incubados a 37°C. Cada espécime era removido, diariamente e desinfetado com álcool etílico a 70%; após a abertura dos conjuntos, foram coletadas amostras do interior com pontas de papel absorvente estéril, isto repetido durante cinco dias (120 horas). Estas pontas eram colocadas em caldo TSB e era verificada a turvação do mesmo. Posteriormente, numa segunda etapa, foram colocados 2µl do caldo de cultura contaminado no interior do hexágono interno do implante e no oco do parafuso do pilar. Os conjuntos foram montados e imersos individualmente em caldos TSB estéreis por duas vezes: uma, com o conjunto coroa/implante completamente imerso (imersão do microvalamento marginal e espaço do parafuso transversal da coroa pré-fabricada) e num segundo tempo, quando o conjunto foi parcialmente imerso (imersão de somente o microvalamento marginal da coroa pré-fabricada). No período de 24 a 120 horas foi observada infiltração bacteriana do ambiente para o interior do conjunto e vice-versa. A principal via de penetração bacteriana foi possivelmente o espaço do parafuso transversal e não o microvalamento marginal das coroas pré-fabricadas.

Gross; Abramovich e Weiss (1999) avaliaram o grau de microinfiltração na interface implante/pilar de cinco sistemas, fazendo uma avaliação comparativa de torques de fechamento variados. Usando sondagem de traços de corantes direcionados por sistema de pressão de 2atm, a infiltração na interface dos implantes Branemark® (hexágono externo); Sulzer Calcitek® (interface em chaveta); 3i® (hexágono externo); ITI® (cônica) e Steri-Oss® (hexágono externo) foi determinada espectrofotometricamente. Os resultados indicaram que fluidos e pequenas moléculas são capazes de passar pela interface de todos os conjuntos implantes/pilares estudados. Os autores concluíram que presumivelmente *in vivo*, fluidos contendo subprodutos bacterianos e nutrientes requeridos pelas bactérias podem passar através do microvalamento da interface, contribuindo, em parte, para o mau odor e perimplantite.

Piattelli et al. (2001) compararam a penetração de fluidos e de *Pseudomonas aeruginosa* em dois diferentes sistemas de implantes: um com pilares cimentados (Bone System®) e outro com pilares parafusados (3i®), ambos com conexão tipo hexágono interno. Foram usados 12 de cada tipo no estudo. A pesquisa foi realizada

em três passos: mensuração dos microvalamentos pelo uso de MEV, análise da penetração de fluido e análise da penetração de bactérias. Foi possível observar que quando os pilares eram parafusados, os microvalamentos tinham uma média de 2 a $7\mu\text{m}$ enquanto nos cimentados, a interface media $7\mu\text{m}$, entretanto estava completamente preenchida pelo cimento de fixação. A penetração de fluido foi verificada utilizando papel absorvente no interior do implante e uma solução corante na parte externa do mesmo. No grupo dos pilares parafusados foi possível observar a presença de azul de toluidina no nível da interface implante/pilar e nas roscas internas, pois o papel foi manchado em todos os casos. No dos pilares cimentados, o papel absorvente não foi manchado pelo azul de toluidina. A penetração do corante não foi observada em nenhuma das interfaces e nem no interior dos implantes. Em todos os conjuntos parafusados foi observada penetração bacteriana na interface implante/pilar. Nenhuma bactéria foi detectada no interior dos implantes com pilares cimentados. Os autores concluíram que os implantes com pilares cimentados ofereceram melhores resultados em relação à permeabilidade de fluidos e bactérias.

Proff et al. (2006) investigaram a capacidade de *P. gingivalis*, um patógeno implicado em perimplantiites severas, penetrar e permanecer vivo no microvalamento implante/pilar de um sistema de implante de titânio usado para ancoragem ortodôntica. Testaram também a efetividade da gutapercha para selamento do microvalamento. Doze implantes de titânio (Straumann® com interface plana, diâmetro 3,3mm e comprimento 5,5mm) foram providos com pilares num torque definido (20Ncm), seis dos quais foram selados com gutapercha antes de serem parafusados no pilar. Em seguida, os implantes foram colocados em um caldo nutriente que continha *P. gingivalis*. Após uma incubação durante 24 a 72 horas, coletaram amostras do interior dos implantes e cultivaram-nas. Houve evidência de que a penetração dessa espécie no interior do implante, mesmo após a “vedação”, ocorreu tão cedo quanto após 24 horas. A sobrevivência da bactéria é possível no interior do implante, de tal forma que o desenvolvimento de um reservatório de bactérias é suposto.

Duarte et al. (2006) usaram suspensão de *Enterococcus faecalis* para testar a capacidade de selamento de dois materiais em cinco diferentes superfícies implante/pilar: quatro conexões do tipo hexagonal externa (Conexão®, Titamax®, EX Serson Implant® e Titanium Fix®) e uma conexão do tipo hexagonal interna

(Colosso[®]). Sessenta implantes foram divididos em cinco grupos experimentais, sendo testadas dez interfaces para cada grupo. O grupo-controle foi composto de duas interfaces de cada grupo. Na primeira fase, 2µl de caldo BHI foram depositados no interior dos implantes. Um selante “varnish” ou “silicon” foi aplicado na porção cervical dos implantes dos grupos experimentais. O grupo-controle não recebeu qualquer dos selantes. Os pilares foram apertados com uma chave de torque manual com 20Ncm, imersos em 4ml de caldo BHI e incubados a 37°C por 72 horas para excluir contaminação. Na segunda fase, 100µl de suspensão de *E. faecalis* foram depositados dentro dos caldos de cultura. A capacidade de selamento foi verificada após sete, 14, 21, 35, 49 e 63 dias. Os pilares foram removidos e foram usadas pontas de papel estéril para coletar material de dentro dos corpos dos implantes. Este material foi transferido para novos tubos com caldo BHI para verificar a presença de turvação em 24 e 48 horas. Não houve diferenças significativas estatisticamente entre os dois materiais para cada período de tempo. Os implantes Colosso[®] mostraram o menor nível de capacidade de selamento (seis implantes contaminados), enquanto os Titanium Fix[®] mostraram o mais alto nível (somente dois). Os autores concluíram que os materiais testados não foram capazes de prevenir a contaminação por 63 dias; a contaminação bacteriana foi verificada após 14 e 35 dias nos grupos-controle e experimentais, respectivamente; embora os materiais testados tenham mostrado similares capacidades de selamento, os implantes dentais mostraram contaminação bacteriana independente de suas configurações hexagonais, externa ou interna.

2.2 Estudos *in vivo* sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de outros sistemas de conexão de implantes dentários

Examinando por microscopia de contraste de fase diferencial a parte apical de dois parafusos dos pilares colocados havia três meses em nove pessoas, Quirynen e van Steenberghe (1993) observaram que todos abrigavam uma quantidade significativa de células bacterianas, principalmente cocóides (86,2%) e bastonetes sem mobilidade (12,3%), enquanto bastonetes móveis (1,3%) e espiroquetas (0,1%) foram observados apenas esporadicamente. A origem dessa contaminação seria uma infiltração na interface implante/pilar.

Sennerby e Lekholm (1993) mostraram que a contaminação dos pilares protéticos pode causar inflamação nos tecidos moles, num trabalho realizado em 20 pilares removidos duas semanas após terem sido instalados. Os pilares, após passarem por limpeza em ultrassom com butanol e etanol e autoclavados, foram implantados sob a pele de ratos, onde permaneceram por seis semanas. Os pesquisadores constataram inflamação e destruição dos tecidos em torno dos pilares, independentemente do método de limpeza e esterilização utilizado e diferentemente do grupo-controle, no qual os pilares não haviam sido contaminados. Essa mesma situação clínica pode ocorrer com os tecidos perimplantares em humanos.

Persson et al. (1996) examinaram a microbiota presente na superfície interna dos componentes de 28 implantes do sistema Branemark® (hexágono externo) instalados em dez parcialmente desdentados e que suportavam próteses parciais fixas por um período de um a oito anos. As próteses foram testadas para verificar mobilidade e removidas. Os parafusos dos pilares foram removidos e classificados como estáveis, facilmente removidos e frouxos. As amostras coletadas da superfície interna dos implantes foram semeadas em placas com ágar-sangue e identificadas. As superfícies internas de diferentes componentes dos implantes Branemark® após períodos variáveis de função na cavidade bucal, apresentaram uma microbiota heterogênea e predominantemente anaeróbia. Não pôde ser observada relação entre o tipo e o comprimento do pilar, a estabilidade do pilar, a perda óssea e o tipo e o número de microrganismos encontrados nas amostras. A microbiota era constituída principalmente de estreptococos anaeróbios e facultativos, bastonetes anaeróbios Gram-positivos tais como os gêneros *Propionibacterium*, *Eubacterium* e *Actinomyces* e bastonetes anaeróbios Gram-negativos incluindo os dos gêneros *Fusobacterium* e os atuais *Prevotella* e *Porphyromonas*. Os pesquisadores sugeriram que essa presença de bactérias é o resultado de uma contaminação dos componentes do implante e pilar durante os estágios de instalação dos mesmos e/ou uma transmissão de microrganismos do ambiente bucal durante a função subsequente à instalação da prótese.

Callan; O'Mahony e Cobb (1998) examinaram a localização da interface implante/pilar, relativa à crista óssea como um, potencial fator causal de perda óssea cristal associada a implantes. A avaliação clínica de 350 implantes individuais em 255 pacientes indicou uma relação direta entre a localização subgingival da

interface implante/pilar e a perda de osso suporte cristal. Além disto, o exame pela microscopia eletrônica de varredura de 45 implantes que falharam mostrou significativo acúmulo de placa bacteriana nas interfaces implante/pilar, prótese/pilar e na colar polido/superfície coberta com plasma-spray subjacente. A interface entre implante/pilar examinada, foi sempre caracterizada por um microvalamento que variou de 30 a 135 μ m e os autores alegaram que em alguns casos o microvalamento pode ter sido forçadamente aumentado pela manipulação durante a remoção cirúrgica.

Keller; Bragger e Mombelli (1998) compararam as características clínicas e microbiológicas da área em torno de implantes que suportavam supra-estruturas cimentadas e parafusadas, para investigar a relação entre as microbiotas: perimplantar, da superfície interna da supra-estrutura removível e a periodontal dos mesmos pacientes. Em 15 parcialmente desdentados com implantes ITI[®] usados como suportes para reconstruções de coroas e pontes, amostras microbianas foram tomadas da bolsa periodontal mais profunda de cada quadrante, dos sulcos em torno dos implantes e da superfície interna da supra-estrutura parafusada. Foram realizados cultivos das amostras usando técnicas anaeróbicas contínuas. Cinco pacientes apresentavam ambos os tipos de supra-estruturas: parafusadas (grupo P) e cimentadas (grupo C). Nestes indivíduos, a média total de contagem cultivável foi significativamente mais alta nas amostras do grupo C do que nas do P. Além disso, a microscopia de campo escuro revelou que as amostras perimplantares do grupo P produziram mais alta proporção de células cocóides e ausência de grandes espiroquetas. *P. gingivalis* foi detectado em 10% das amostras periodontais e em somente uma perimplantar. *P. intermedia* foi detectado em 33% das periodontais e em 30% das perimplantares. *Fusobacterium* spp teve uma prevalência de 58% nas amostras periodontais e foi recuperado de 50% das amostras perimplantares. *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em qualquer amostra periodontal ou perimplantar. Foi demonstrada uma significativa relação entre a freqüência de microrganismos nas amostras perimplantares e em amostras da superfície interna da supra-estrutura. Além disso, houve uma significativa correlação entre a incidência de microrganismos na amostra dental e nas perimplantares do grupo P e nas amostras da superfície interna da supra-estrutura. Estes achados indicam que a infiltração microbiana através do microvalamento entre a supra-estrutura e o pilar tem um papel importante na colonização bacteriana da parte interna das coroas e

pontes parafusadas. O estudo, além disso, confirmou o impacto da microbiota dental na colonização dos implantes. Este fator parece ser mais importante do que o modo de fixação da supra-estrutura.

Orsini et al. (2000) removeram um bloco ósseo de uma pessoa que, cinco meses antes de seu falecimento, havia recebido dois implantes osseointegrados com interface plana. Um microvalamento de 1 a 5 μ m estava presente entre o implante e o cicatrizador e este espaço era preenchido por bactérias e cálculo; bactérias estavam também presentes na porção mais apical do interior oco do implante. Na análise histológica se constatou infiltrado inflamatório nos tecidos adjacentes à junção implante/cicatrizador. Para os autores, os espaços entre todos os componentes dos implantes podem atuar como condutores e reservatórios para bactérias que podem causar inflamação dos tecidos moles perimplantares.

Rimondini et al. (2001) avaliaram a contaminação interna do parafuso de retenção pilar/implante após carga oclusal e reconstrução cimentada provisoriamente com e sem arruela (vedação). Oito implantes de dois componentes, selados com uma arruela de silicone e nove sem o selamento foram colocados em sete pacientes com alto padrão de higiene bucal. A contaminação microbiana foi mais freqüentemente observada nos implantes não-selados. Nenhuma diferença nos morfotipos bacterianos foi observada entre os selados e não-selados. Os cocos foram os morfotipos mais representativos, enquanto bastonetes foram vistos raramente. Os autores concluíram que a microinfiltração ocorre na interface implante/pilar, mas é limitada em pacientes com alto padrão de higiene e que essa contaminação pode ser reduzida pelo uso de instrumento de vedação (arruela).

Em sua dissertação de Mestrado na Universidade de Santo Amaro, Oliani (2004) avaliou a eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle da proliferação bacteriana na interface coroa/pilar protético de próteses dentais parafusadas em fixações de hexágono externo. Foram removidas as coroas e dois pilares de coroas do tipo Multi-unit de quatro pacientes portadores de dois implantes cada. Após a desinfecção da área interna de cada coroa, foram coletadas duas amostras da microbiota desta região, com ponta de papel absorvente estéril para serem analisadas em laboratório. Após a primeira coleta, antes da recolocação das próteses, uma interface coroa/pilar protético foi tratada com solução de clorexidina a 2% e a outra não (controle). Após 30 dias, foi feita a segunda coleta em dois pacientes e 90 dias após a primeira coleta, nos outros dois, para identificação das

espécies patogênicas *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis* em cultivos anaeróbios. Para detecção dos DNA dessas espécies e de *T. denticola*, foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) diretamente das amostras clínicas. Nas duas amostras coletadas após 30 dias das áreas (controles) não tratadas com clorexidina, a PCR evidenciou a presença do DNA de *T. denticola*. Das espécies-alvo da pesquisa, nas amostras tratadas com clorexidina foi identificado *F. nucleatum* na primeira (por cultivo) e em nenhuma das outras. Após 90 dias foram identificados *P. gingivalis* e *P. intermedia* em todas as amostras, embora em menor quantidade nas tratadas com clorexidina. Estes resultados sugeriram que a clorexidina pode inibir a proliferação de *P. gingivalis* e *P. intermedia*, mas não de *F. nucleatum*, na interface coroa/pilar protético nos primeiros 30 dias. No entanto, não é capaz de evitar a colonização de *P. gingivalis* e *P. intermedia* tal como foi observado nos resultados das amostras de 90 dias. Resultados muito parecidos foram obtidos, no mesmo ano, por Ferrari, também na Universidade de Santo Amaro, ao analisar a infiltração entre o corpo do implante e o pilar intermediário. Este estudo teve como objetivo a identificação de oito espécies de periodontopatógenos no interior de implantes de hexágono externo e avaliar o uso de solução de clorexidina a 2% no controle bacteriano neste espaço. Os resultados demonstraram a presença de *F. nucleatum* e *T. denticola* nas amostras coletadas 30 dias após a aplicação de clorexidina e de *T. denticola* e *P. intermedia* nas que não receberam essa aplicação. Aos 90 dias foi detectada a presença de *C. rectus* nas amostras dos espaços sem clorexidina e de *P. gingivalis* e *P. intermedia* indiferentemente da aplicação ou não do antisséptico.

Callan; Cobb e Williams (2005) investigaram, por análise de DNA, a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* na superfície interna da interface implante/cicatrizador e roscas do parafuso do cicatrizador de implantes em posição. Após a osseointegração, amostras bacterianas foram coletadas da interface implante/cicatrizador e roscas do parafuso com pontas de papel estéril. Todas as amostras coletadas das roscas do parafuso dos cicatrizadores foram negativas para todos os microrganismos-alvo. A percentagem total de resultados positivos de cada microrganismo nas amostras das superfícies internas foi 41,9% de *A. actinomycetemcomitans*, 60,5% de *T. forsythensis*, 44,2% de *C. rectus*, 60,5% de *E. corrodens*, 48,8% de *F. nucleatum*, 46,5% de *P. gingivalis*, 55,8% de *P. intermedia* e

51,2% de *T. denticola*. Os microrganismos colonizaram essas superfícies dentro de 25 dias seguintes à cirurgia de segundo estágio e colocação do cicatrizador. Por outro lado, as amostras obtidas das roscas dos parafusos de 11 cicatrizadores foram negativas. Esses resultados pareceram suportar aqueles de outras investigações que demonstraram a translocação de bactérias da dentição residual para os implantes.

Covani et al. (2006) examinaram a distribuição de bactérias na superfície interna e externa de implantes que falharam, usando análise histológica em dez implantes de titânio puro e cinco com cobertura de hidroxiapatita. O critério para a remoção dos implantes foi radiolucência perimplantar e mobilidade clínica. A remoção foi feita mantendo os pilares com o objetivo de observar a infiltração bacteriana no nível da interface implante/pilar e na superfície do implante. Os parafusos dos pilares estavam apertados em todas as situações clínicas. As células bacterianas eram cocos e filamentos que estavam aderidos à superfície do implante com uma orientação perpendicular ao longo eixo do mesmo. Todos os espécimes incluídos neste estudo apresentavam bactérias no nível da interface implante/pilar. A análise histológica no nível da interface de implantes de dois estágios identificou uma pesada colonização bacteriana. Segundo os autores, esses achados pareceram suportar estudos anteriores que mostraram penetração de bactérias no nível do microvalamento, que pode legitimar a hipótese que o microvalamento no nível ósseo pode apresentar um risco para a perda óssea causada pela colonização bacteriana.

Heijdenrijk et al. (2006) avaliaram a viabilidade do uso de um sistema de implantes de duas peças e estudaram o impacto do microvalamento entre o implante e pilar. Os implantes instalados em 60 desdentados foram divididos em três grupos: implantes em um procedimento não-submerso, em procedimento submerso tradicional e de uma peça em procedimento não-submerso tradicional. Avaliações clínica e radiográfica foram realizadas imediatamente após instalação das próteses e anualmente por cinco anos. Amostras perimplantares foram coletadas 12, 36 e 60 meses após os implantes terem sido submetidos à carga, com pontas de papel estéril, e analisadas, por cultivos, para verificar presença de patógenos periodontais. Após cinco anos de funcionamento, nenhuma diferença significativa clínica, radiográfica ou microbiológica foi encontrada entre os três grupos e nenhuma associação foi encontrada entre o nível do microvalamento e a quantidade de perda

óssea. Na opinião dos autores, os implantes designados para procedimentos de implantação submersa podem também, serem usados em procedimentos não submersos e podem ser tão previsíveis quanto, quando usados em procedimentos submersos ou como os implantes de uma peça. O microvalamento ao nível da crista em implantes de duas peças não pareceu ter um efeito adverso na quantidade de perda óssea periimplantar.

No seu trabalho de Mestrado na Universidade de Santo Amaro, utilizando a PCR, Sartori (2006) constatou que a inserção de uma placa de silicone entre o pilar protético e a base de 15 implantes de hexágono externo não conseguiu evitar a penetração de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis* num período de observação de 30 e 90 dias.

2.3 Estudos *in vitro* sobre infiltração microbiana nos microvalamentos de implantes dentários com sistema de conexão cônica

Existem muito poucos estudos na literatura que foram processados para investigar o selamento da interface implante/pilar à infiltração microbiana proporcionado pelos sistemas de implantes dentais fabricados com conexão cônica.

Jansen; Conrads e Richter (1997) testaram essa hipótese inoculando 0,5 µl de *E. coli* na extremidade de pilares protéticos das marcas Astra[®], Ankylos[®] e Bonifit[®], montando os sistemas e colocando-os num caldo nutriente que cobria as margens implante/pilar. A ocorrência de infiltração dessa bactéria foi determinada por cultivo.

Dibart et al. (2005) avaliaram o selamento do sistema Bicon[®] à infiltração bidirecional de bactérias. Vinte e cinco (25) conjuntos de implantes e pilares foram divididos em dois grupos para as duas fases do experimento. Na primeira foi testada a penetração de bactérias na interface implante/pilar. Para tanto, dez conjuntos foram imersos, durante 24 horas, em um meio de cultura contendo uma mistura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (denominação atual), *Streptococcus oralis* e *Fusobacterium nucleatum*. Os pilares foram então separados dos implantes e a presença de bactérias foi avaliada usando o MEV. Na segunda fase os autores testaram se as bactérias inoculadas no interior do implante infiltram para fora. Os pilares foram inoculados com uma gotícula de 0,1µl de um "ágar mole" (líqüefeito a 45^oC em banho-maria) contendo a mistura bacteriana. A seguir foram montados nos implantes e os conjuntos incubados em caldos nutritivos estéreis por 72 horas; em

seguida foi retirada uma amostra, que foi semeada para se avaliar a presença de bactérias. Na fase 1, nenhuma bactéria foi detectada no interior de qualquer dos implantes. Na fase 2, nenhuma bactéria foi detectada no caldo ou no ágar nutritivo. Os autores concluíram que a conexão cônica usada nesses implantes não permite a infiltração bacteriana.

2.4 Estudos para mensurar os microvalamentos de implantes dentários com sistema de conexão cônica

No estudo de Jansen; Conrads e Richter (1997), os microvalamentos da interface implante/pilar com conexão cônica das marcas Ankylos[®], Astra[®] e Bonelit[®] foram avaliados por análise processada em microscópio eletrônico de varredura. A medição foi realizada em um conjunto de cada tipo, selecionado aleatoriamente, em quatro regiões, com magnificação de 775 vezes numa vista de ângulo paralelo à parte mais externa da zona da interface. Todos os pilares cônicos mostraram um microvalamento marginal agudo, em ponto, claramente visível (independente do tamanho absoluto), tal que sua largura podia facilmente ser medida. Os microvalamentos dos conjuntos Astra[®] e Bonelit[®] tiveram uma constante largura de 1 a 2 μ m enquanto a discrepância marginal para o pilar Ankylos[®] foi de 4 μ m, e ligeiramente ampliado em um lado do implante.

Conforme Dottori (2003), o microvalamento mediu 0,0 μ m em dois conjuntos implante/intermediário do sistema Ankylos[®], um conectado ao pilar Cercom (em titânio) e outro com o pilar Cercom Balance (em zircônia), ambos de conexão cônica e adaptados com um torque de 15Ncm. A autora não esclareceu se foi analisado mais de um ponto em toda a interface de cada conjunto.

Já no estudo de Dibart et al. (2005), a medida do microvalamento proporcionado pela interface do sistema Bicon[®], também pela microscopia eletrônica de varredura mostrou ser menor que 0,5 μ m.

3 PROPOSIÇÃO

Em virtude da carência de pesquisas sobre o tema, neste trabalho nos propusemos a:

- a) avaliar *in vitro* se a interface com conexão cônica do conjunto implante/pilar protético utilizada por duas marcas fabricadas no Brasil (Conexão[®] e Titanium Fix[®]) consegue impedir a infiltração bacteriana bidirecional (de dentro para fora e vice-versa).
- b) utilizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar as medidas dos microvalamentos existentes entre os implantes e pilares protéticos dessas marcas;
- c) utilizar a MEV para analisar a configuração interna dos conjuntos das duas marcas testadas, com a finalidade de auxiliar no esclarecimento das eventuais diferenças na infiltração bacteriana entre os componentes das duas marcas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a Proposição, o nosso primeiro objetivo foi testar a capacidade de selamento de dez conjuntos implante/pilar protético com sistema de conexão cônica, de duas marcas comerciais (Conexão^{®1} e Titanium Fix^{®2}) (Figura 1), à infiltração bidirecional de uma mistura de células de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus epidermidis*. Os testes microbiológicos foram executados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro (UNISA), onde essas bactérias estavam conservadas por congelamento. Para reativá-las, 24 horas antes de cada experimento 100µl de cada cepa previamente descongelada foram semeados em caldo BHI³, que a seguir foi incubado a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica⁴. Após homogeneização do desenvolvimento, uma alíquota foi transferida para ágar-sangue de carneiro, incubado por 48 horas a 37°C.

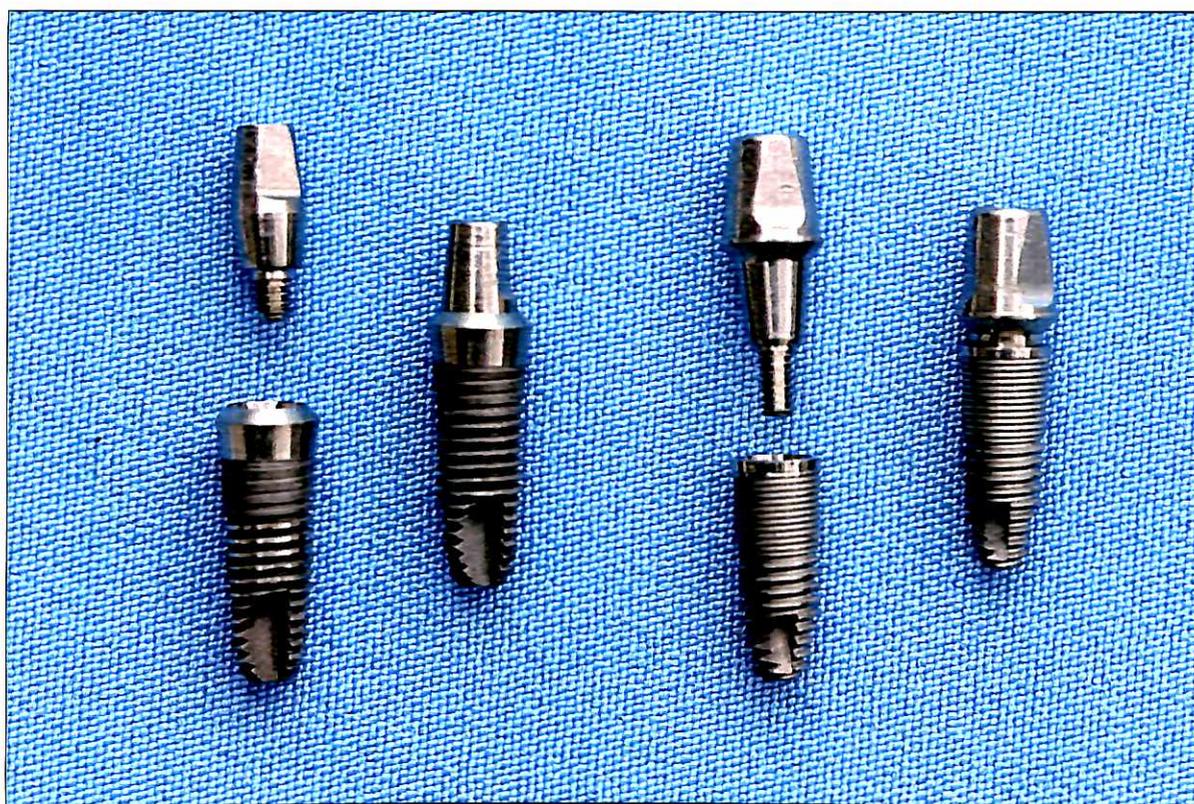


Figura 1 – Implantes com conexão cônica Titanium Fix[®] (à esquerda) e Conexão[®] (à direita), seus respectivos pilares protéticos e os conjuntos conectados.

¹ Conexão[®], Sistemas de Implantes Ltda, Arujá, Brasil.

² Titanium Fix[®], São José dos Campos, Brasil.

³ Biolife[®], Itália.

⁴ Orion[®] 502, Fanem, São Paulo, Brasil.

A constatação da pureza do cultivo misto foi feita pela verificação da presença apenas de colônias compatíveis com os microrganismos-teste e de suas morfologias celulares pelo método de coloração de Gram.

4.1 Cuidados gerais de assepsia

Para a execução de todos os testes que compuseram a pesquisa, foram tomadas medidas, como a desinfecção da bancada de trabalho com álcool-iodado a 1%, o forramento da bancada com campos cirúrgicos estéreis e a paramentação da operadora com luvas, gorro e máscara, para evitar a contaminação das peças dos implantes por microrganismos existentes no meio ambiente. Os experimentos bacteriológicos foram realizados na área de proteção proporcionada pelo calor emanado pelas chamas de fogo de dois bicos de Bunsen.

Todos os materiais utilizados, incluindo a morsa e instrumentais como o torquímetro¹ e as chaves para torque^{1 e 2} (Figura 2) foram previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

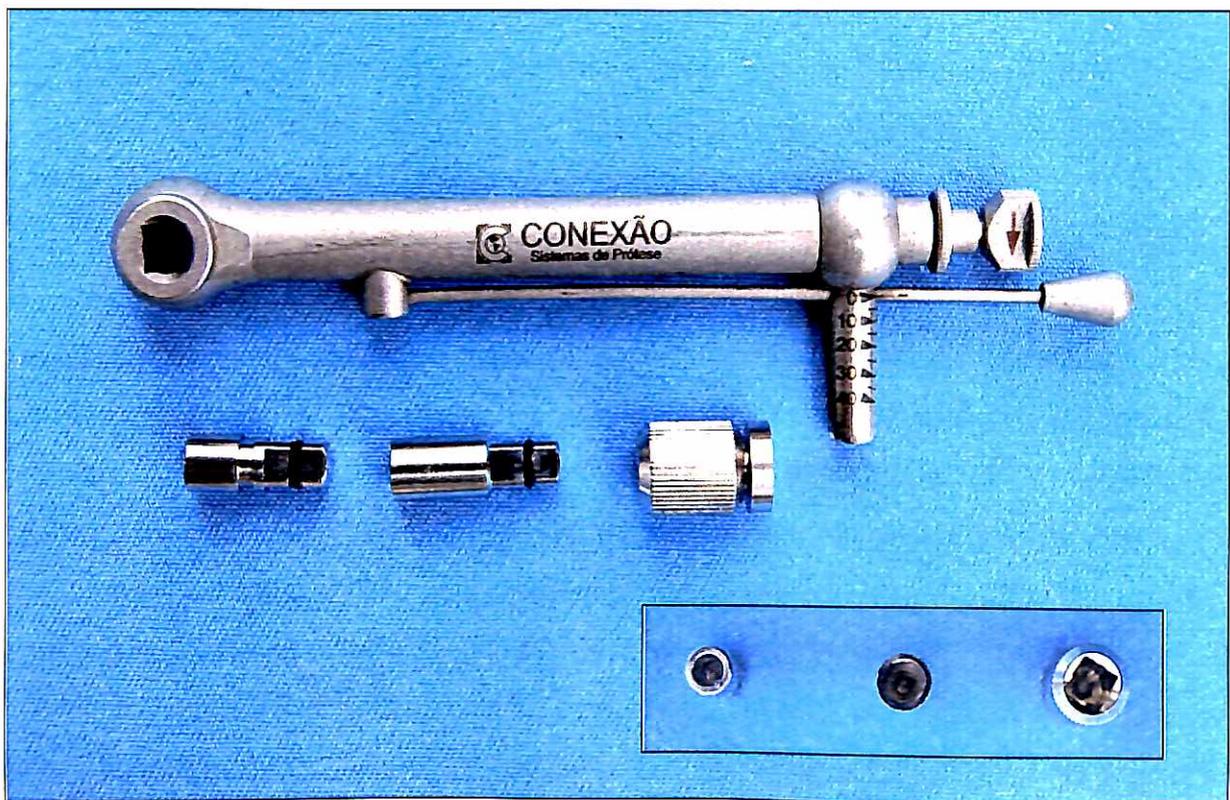


Figura 2 – Torquímetro Conexão®, chaves quadradas Titanium Fix® e Conexão® (da esquerda para a direita) e extensor de chave quadrada Conexão® (terceira da esquerda para a direita). Visão de topo das chaves e extensor, no detalhe.

4.2 Testes microbiológicos preliminares

Previamente aos experimentos bacteriológicos, testamos a viabilidade bacteriana entre os componentes do implante durante 48 horas e o estado de esterilidade das pontas de papel absorvente usadas na coleta de material e dos implantes utilizados.

Para avaliarmos o primeiro quesito, 0,3µl de uma mistura em volumes iguais de uma suspensão das duas bactérias foi inoculado no interior oco do implante, o pilar foi assentado cuidadosamente e ajustado com os torques recomendados pelos fabricantes: 35Ncm para os implantes da Titanium Fix® e 20Ncm para os da Conexão®. Após incubação em estufa bacteriológica por 48 horas a 37°C, o conjunto foi aberto, o conteúdo interior foi coletado com uma ponta de papel absorvente estéril número 50 utilizado em Endodontia⁵ semeado em caldo BHI para a constatação da presença ou ausência de colônias.

Embora no rótulo constasse que as pontas de papel absorvente estavam estéreis, constatamos que estavam contaminadas e, por esta razão, antes de seu uso foram todas autoclavadas e posteriormente foi confirmada sua esterilidade pela ausência de desenvolvimento bacteriano em caldo BHI³.

A confirmação do estado de esterilidade dos implantes das duas marcas comerciais utilizadas também foi possível de ser determinada pela ausência de desenvolvimento nos caldos BHI onde foram incubados.

Também foi realizado um experimento-piloto para se verificar a quantidade do inóculo bacteriano que poderia ser inserido no interior dos implantes das duas marcas comerciais, sem que houvesse extravasamento para as partes externas, o que resultaria em resultado falso positivo. Para tanto, o conjunto implante/pilar protético foi depositado em caldo BHI, tendo-se constatado, pela ausência de desenvolvimento, que 0,3µl era uma quantidade adequada para esse propósito.

Vinte e seis (26) conjuntos de cada marca foram utilizados para o experimento, sendo cinco para os testes preliminares (um para o teste de esterilidade do conjunto, um para o teste de viabilidade da bactéria e três para se definir a quantidade apropriada de inóculo a ser inserido no interior do implante); dez para cada uma das duas fases do experimento (testes de infiltração de dentro

⁵ Tanari®, Tanariman Industrial Ltda, Brasil

para fora e de fora para dentro) e um como controle negativo. As características gerais dos componentes desses implantes e os torques recomendados para sua conexão estão colocados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais dos componentes dos implantes testados e os torques recomendados para sua conexão.

Produto	Implante	Pilar Protético	Interface	Conicidade	Torque
Conexão®	Master AR Morse Porous Φ 3,75 x 10,0mm	Pilar Speed 1,0 C.M.	Cônica	13°	20Ncm
Titanium Fix®	Self-Tapping Implant Cone morse Φ 4.0 x 10.0mm	Abutment Cone Morse 4.0mm (CMAC4)	Cônica	8°	35Ncm

4.3 Análise da infiltração bacteriana da interface implante/pilar para o meio externo

Cada implante foi retirado do seu invólucro e firmemente posicionado numa morsa de bancada adaptada para o formato do implante, numa posição vertical, imitando as condições existentes na boca.

Com uma microponteira⁶ acoplada a uma micropipeta⁷ de precisão calibrada para 0,3µl (Figura 3), foi aspirada a suspensão de bactérias contida em um pote Dappen esterilizado, que foi então inoculada na parte interna do implante (Figura 4), com o cuidado de não tocar em sua borda. Em seguida o pilar protético foi adaptado ao implante com chave manual e dado o torque final, novamente de acordo com as instruções e força recomendadas pelos fabricantes (Figura 5).

⁶ Biosphere® Filter Tips 10µl type Gilson/Biohit Sarstedt

⁷ P2 Gilson® Fixed Volume 0,1 a 2µl , World Headquarters Gilson, Inc. USA

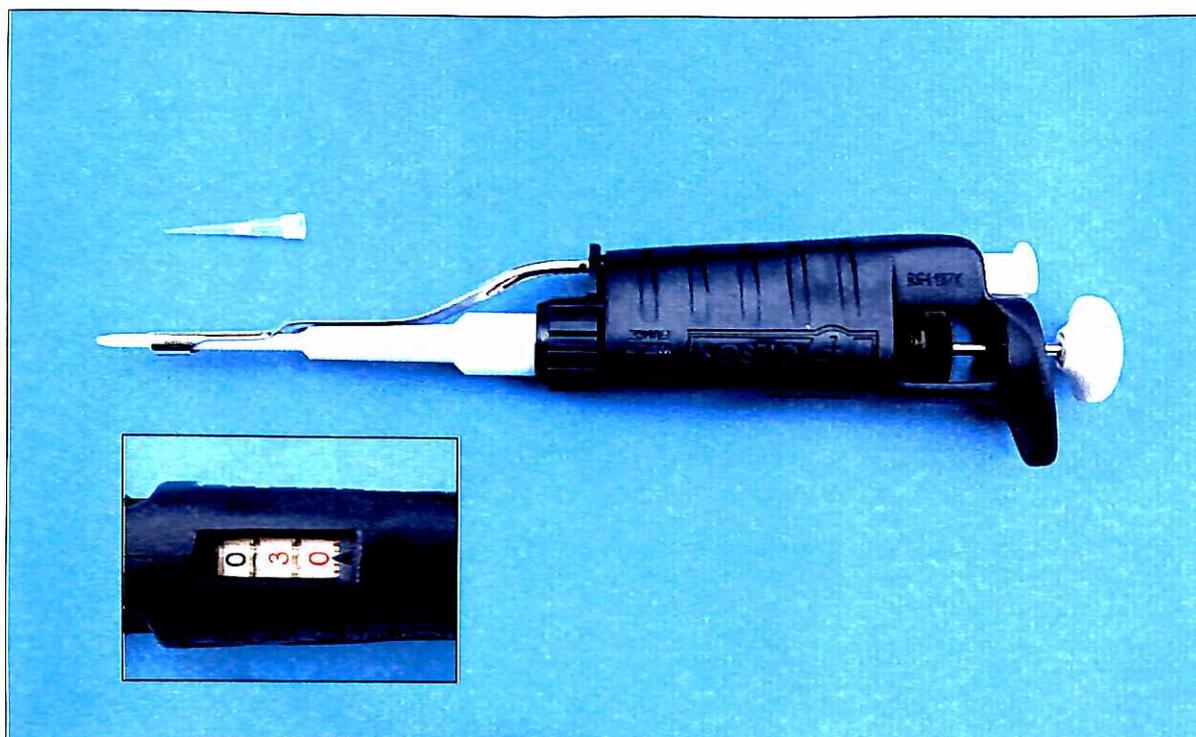


Figura 3 – Micropipeta e microponteira utilizadas; o detalhe mostra a calibração para 0,3 μ l.

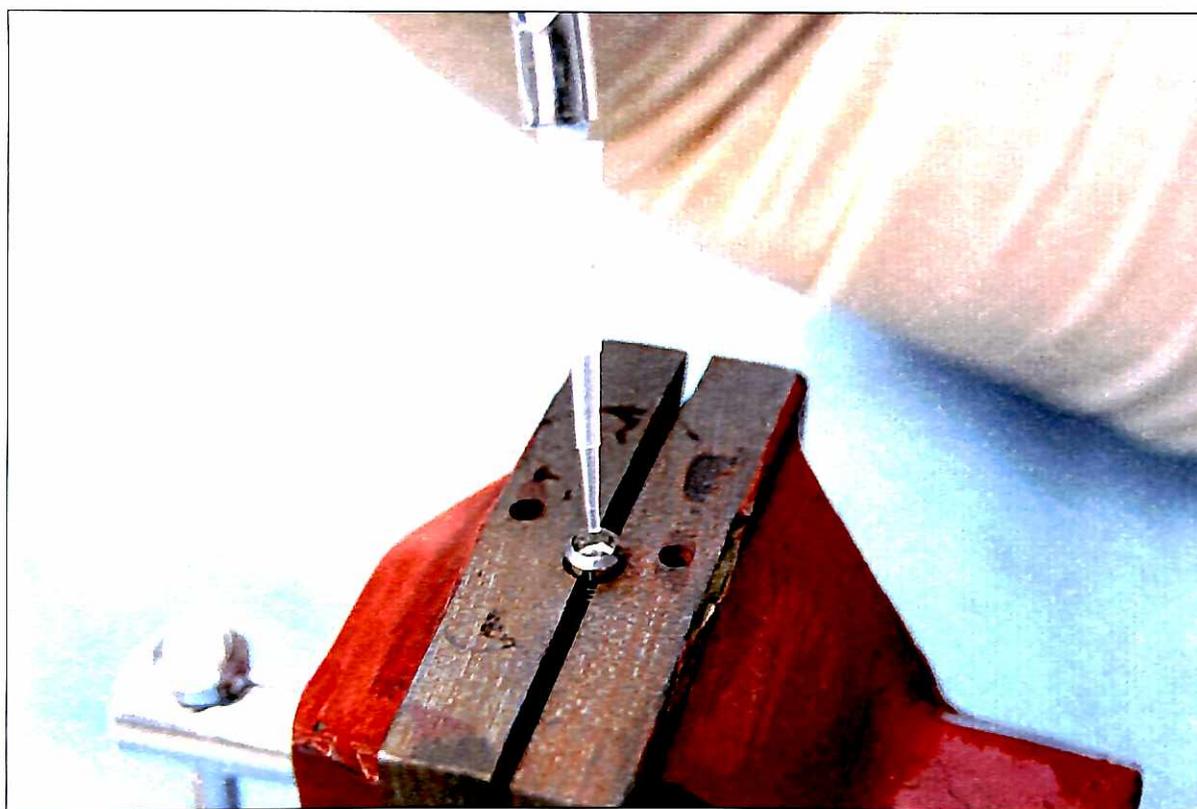


Figura 4 – Inserção do inóculo bacteriano no interior do implante.

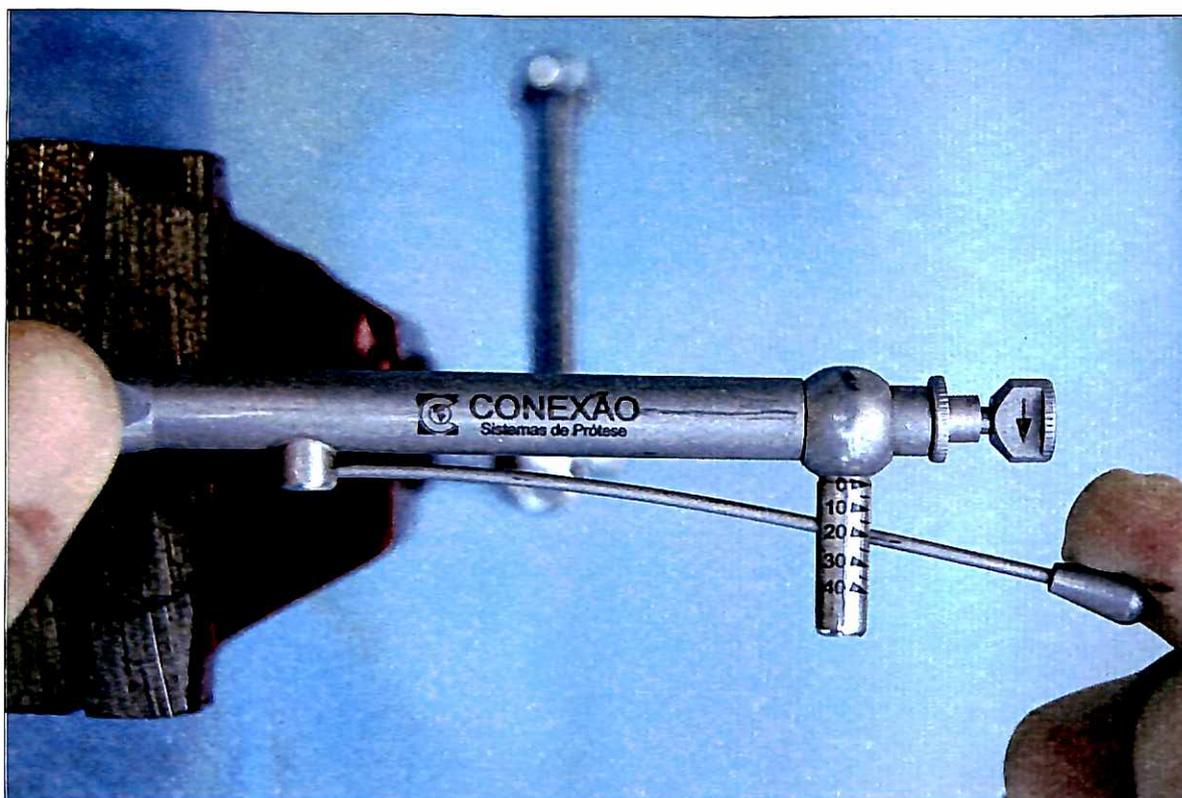


Figura 5 – Torque de 20 Ncm sendo dado num conjunto da Conexão®.

Com o objetivo de verificar se houve contaminação externa na manobra de inserção da mistura de bactérias no interior do implante, uma ponta de papel absorvente número 50 estéril foi umedecida em soro fisiológico estéril e passada pela interface em todo o perímetro externo do conjunto (Figura 6).

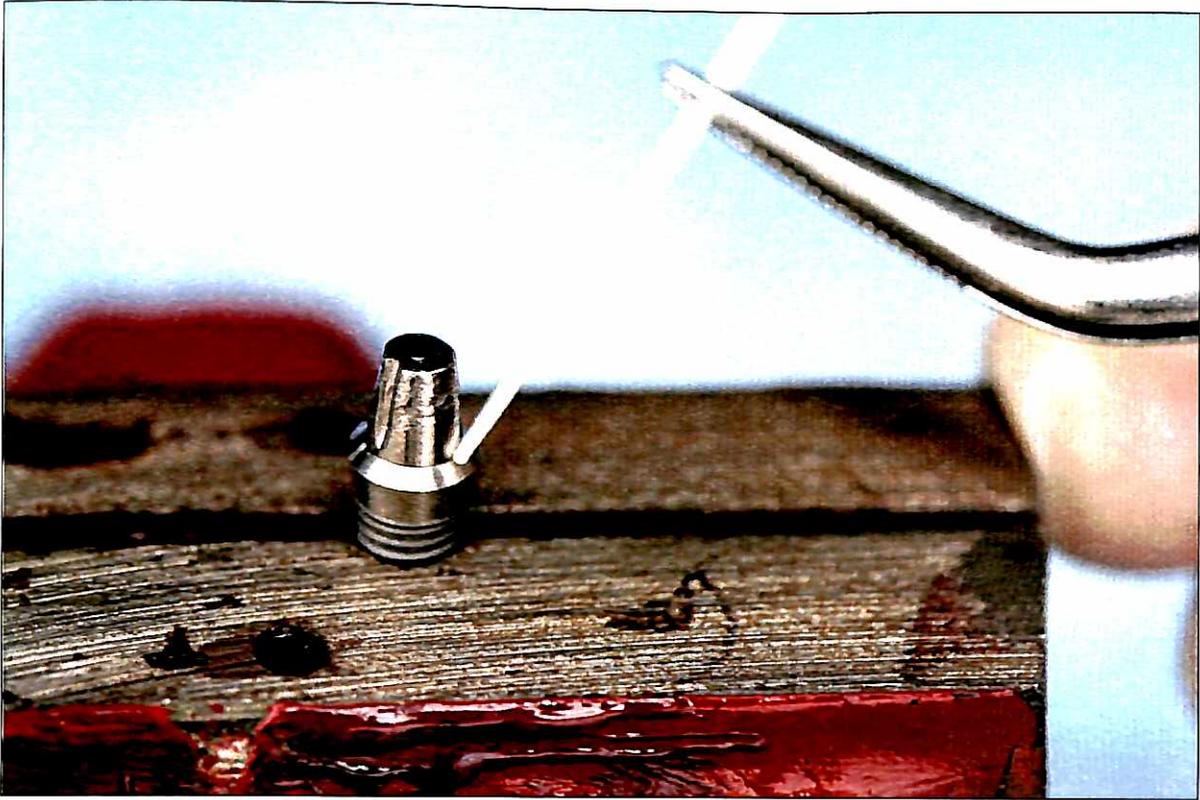


Figura 6 – Verificação de contaminação externa com uma ponta de papel absorvente.

Em seguida, a ponta de papel foi colocada numa placa contendo BHIA³ e após 48 horas foi verificado se houve ou não a contaminação da superfície (Figura 7). Em caso positivo a amostra seria descartada, o que ocorreu em um dos dez implantes Titanium Fix[®].



Figura 7 – Semeadura das pontas de papel que foram passadas na interface em BHIA, para a verificação da contaminação externa.

As unidades implante/pilar foram imersas, individualmente, em dez tubos de cultura contendo 4ml de caldo BHI estéril (Figura 8) e a incubação processada a 37°C por 48 horas. Após este período foi verificado se houve turvação do meio, traduzindo a contaminação bacteriana. Ainda que não tivesse havido a turvação do meio, 10µl do caldo de todos os tubos foram pipetados e semeados na superfície de um BHIA, para certificação de uma possível infiltração. O desenvolvimento mostraria que a bactéria era proveniente da parte interna do implante, ou seja, da interface testada.

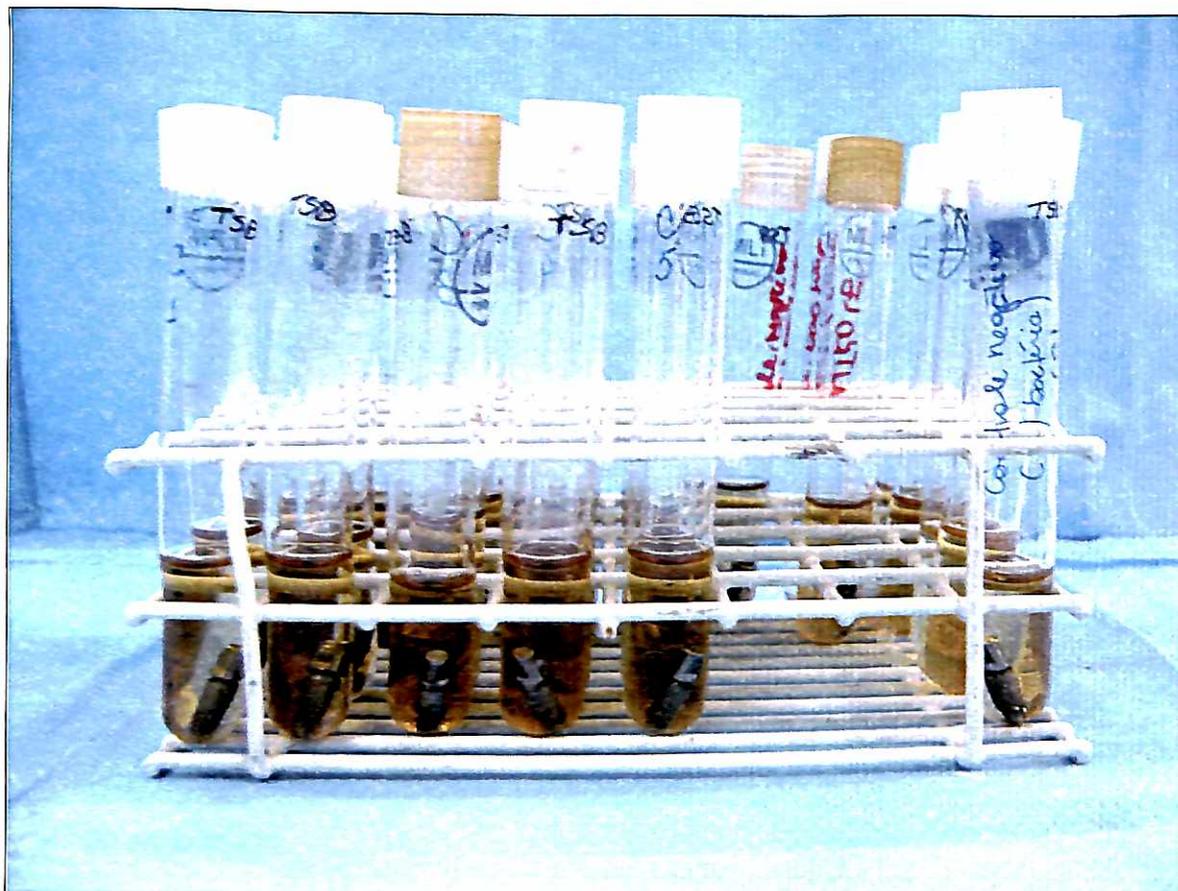
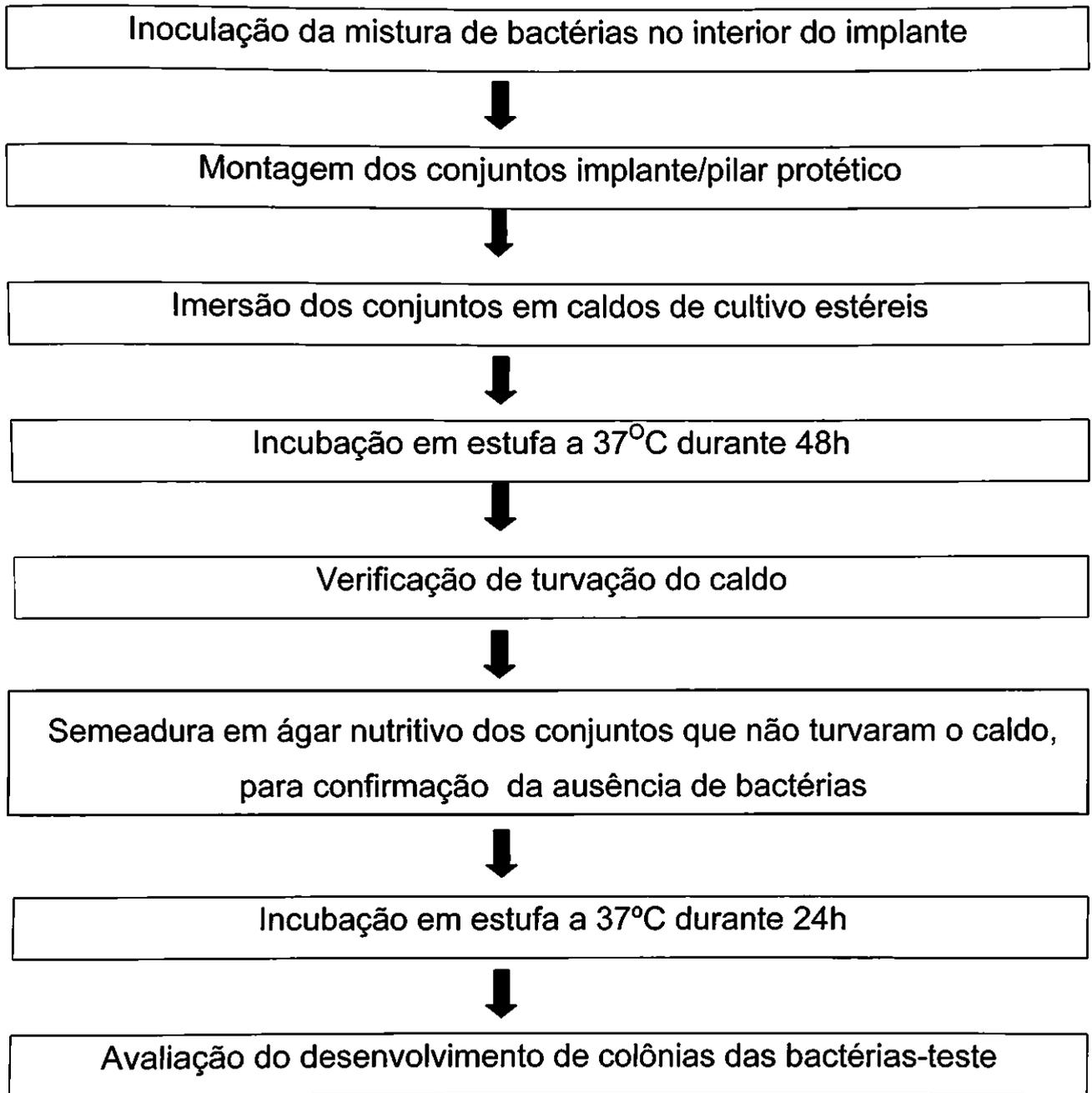


Figura 8 - Conjuntos implante/pilar imersos em caldos BHI estéreis.

Este procedimento foi realizado com dez implantes de cada fabricante. Um outro implante não foi inoculado com bactérias no seu interior, teve o pilar devidamente assentado em posição, imerso também no caldo BHI estéril e foi usado como controle negativo.

A seqüência desses procedimentos está expressa no Fluxograma 1.

FLUXOGRAMA 1

4.4 Análise da infiltração bacteriana do meio externo para a interface implante/pilar

Dez implantes e pilares protéticos de cada fabricante foram usados na execução dessa fase.

Cada conjunto implante/pilar protético foi montado da mesma forma que na primeira fase da pesquisa (Figura 9), porém sem bactérias no seu interior. Cada conjunto montado foi completamente imerso em um tubo de ensaio contendo caldo BHI previamente inoculado com uma suspensão da mistura, em volumes iguais, das duas bactérias (Figura 10) e a seguir, incubado a 37°C por 48 horas.

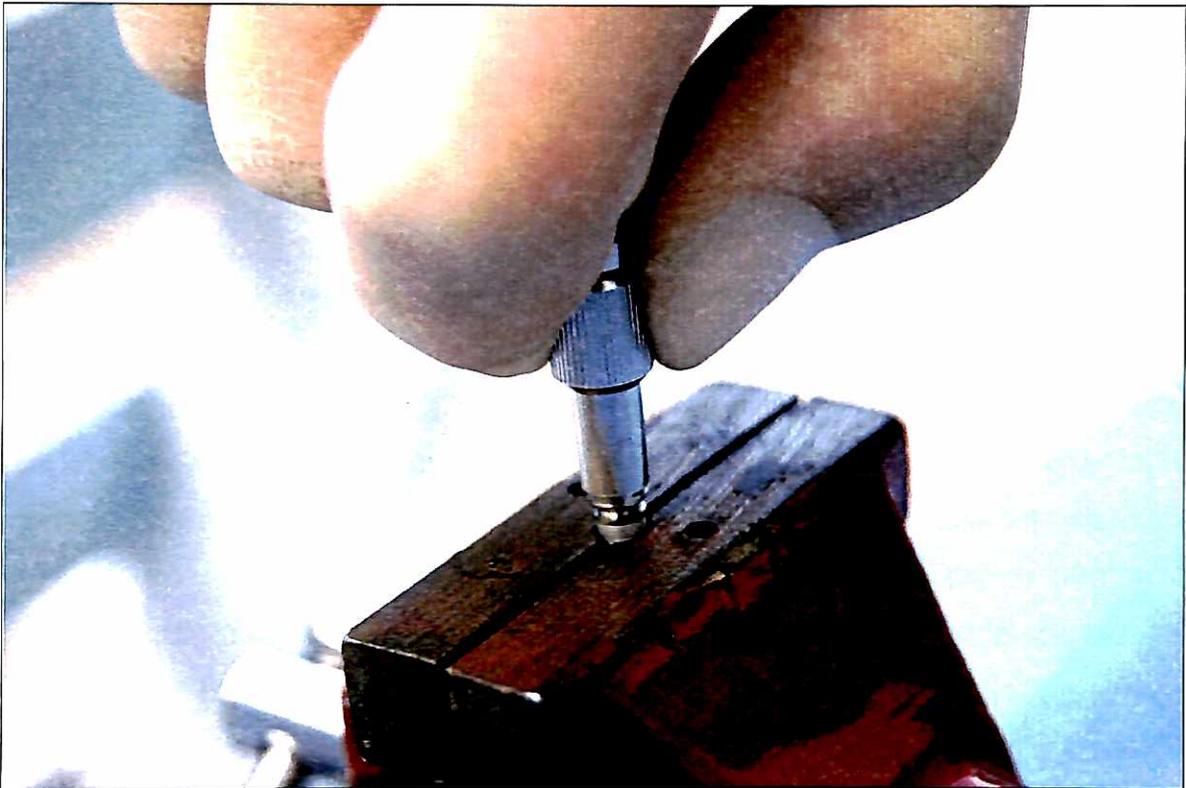


Figura 9 – Conexão manual inicial do pilar ao implante.

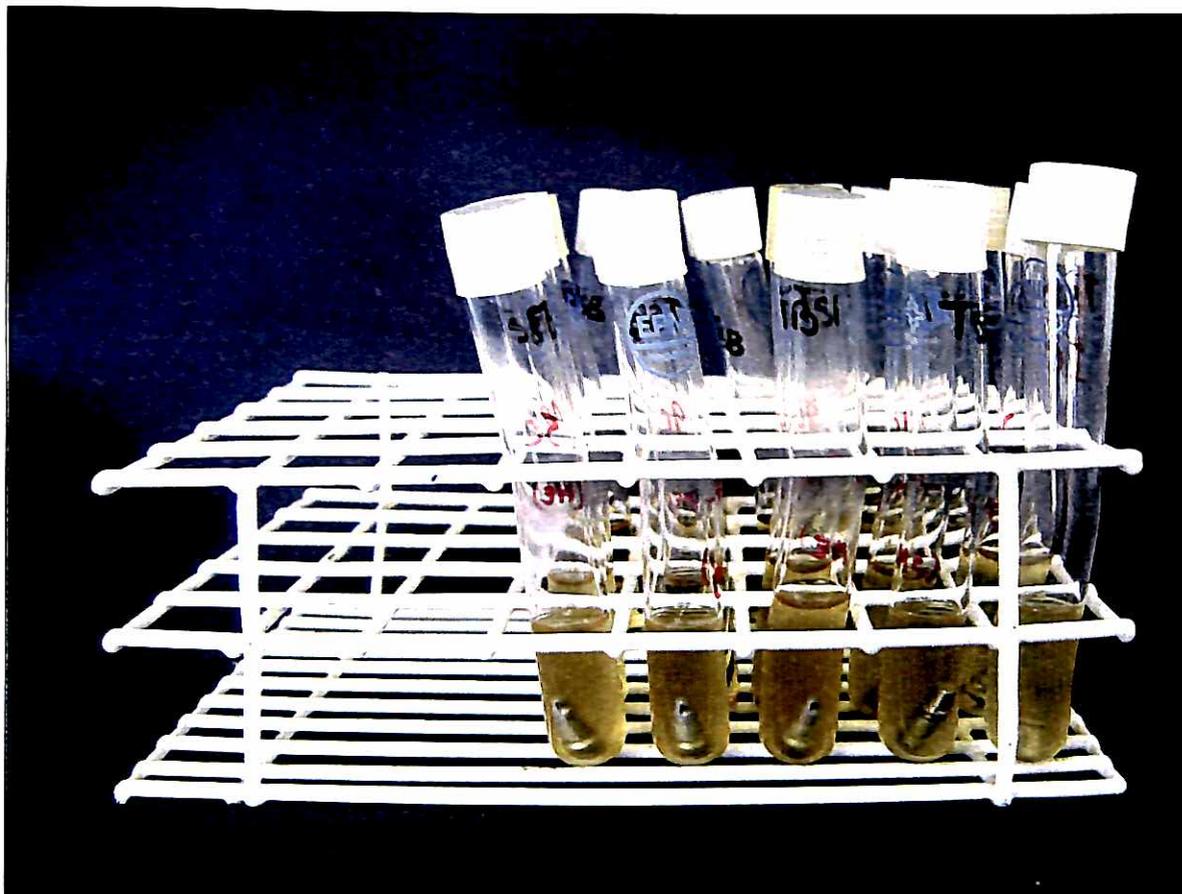


Figura 10 – Conjuntos implante/pilar imersos no caldo de cultura contaminado.

Após esse tempo, os conjuntos foram removidos dos meios de cultivo. Os meios foram vertidos num depósito de vidro previamente esterilizado e os dez conjuntos de cada marca foram colocados sobre gazes estéreis depositadas no interior de uma placa de Petri esterilizada, para uma absorção prévia (Figura 11); posteriormente foram bem secos com gaze estéril friccionada em toda sua extensão, para prevenir a penetração do remanescente do meio inoculado presente na interface durante a separação dos componentes.

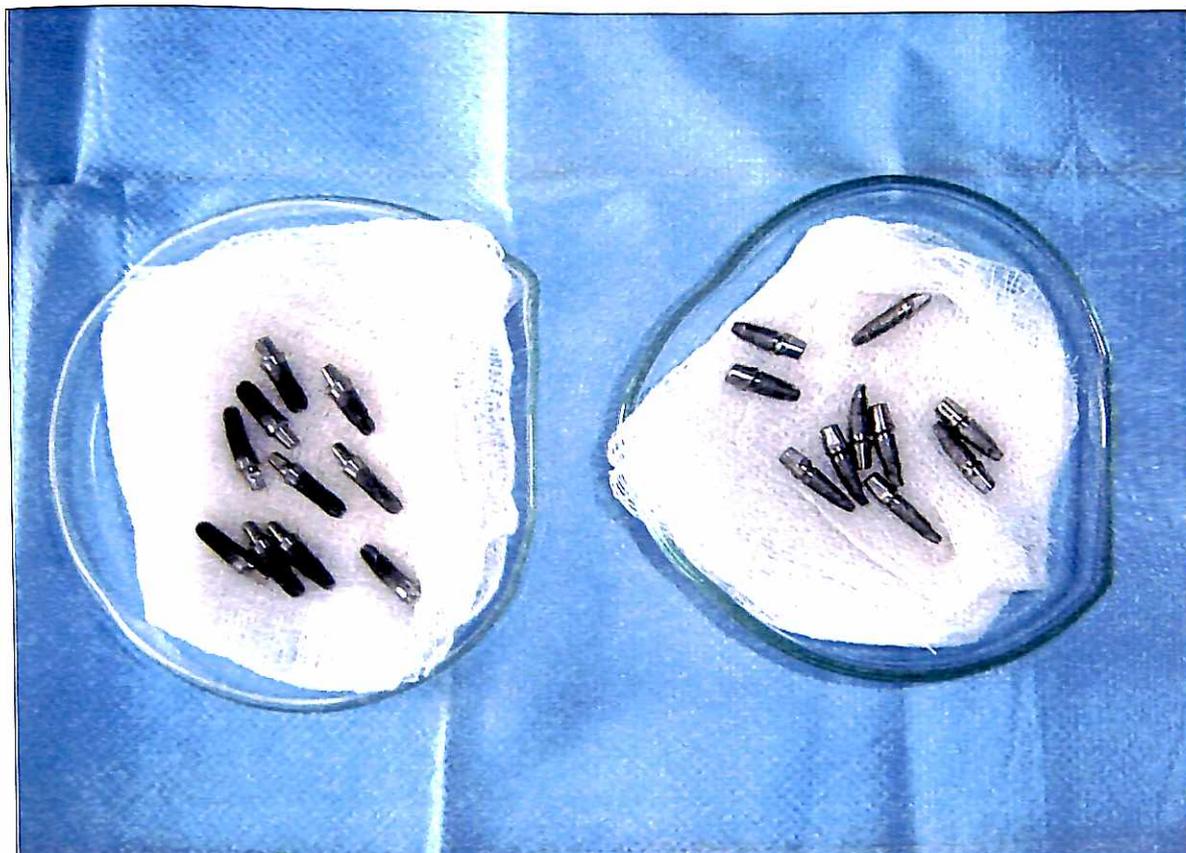


Figura 11 – Conjuntos removidos do caldo BHI contaminado e colocados sobre gazes esterilizadas, para absorção inicial.

O conjunto implante/pilar protético foi firmemente posicionado na morsa e o pilar foi desconectado com uma chave apropriada por nós confeccionada em alumínio (Figura 12). A morsa foi adaptada de acordo com a forma dos implantes, para que os mesmos não girassem quando em posição ao serem submetidos aos torques recomendados pelos fabricantes. Após a separação dos componentes, a parte interna do implante foi preenchida com 5 μ l de solução salina estéril, a fim de se obter uma suspensão dos microrganismos aderidos à superfície interna do implante. Dez segundos após, a solução salina foi absorvida por uma ponta de papel absorvente estéril por dez segundos (Figura 13) e a mesma foi passada cuidadosamente nas paredes laterais sem que houvesse toque na borda do implante.

As amostras foram semeadas em BHIA e após 48 horas de incubação a 37 $^{\circ}$ C foi verificado se houve ou não desenvolvimento de colônias.

...

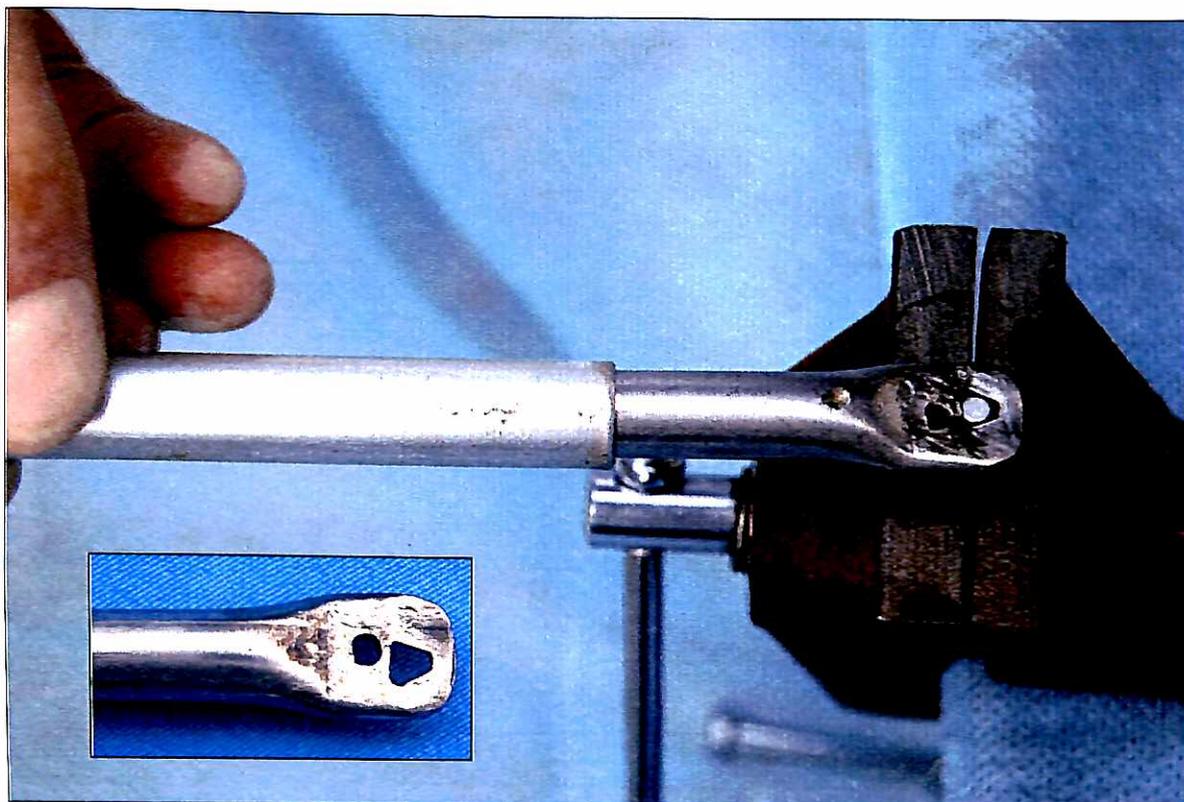


Figura 12 – Destorque dos pilares com chave confeccionada de acordo com a forma da extremidade do pilar. Visão em detalhe da ponta da chave.

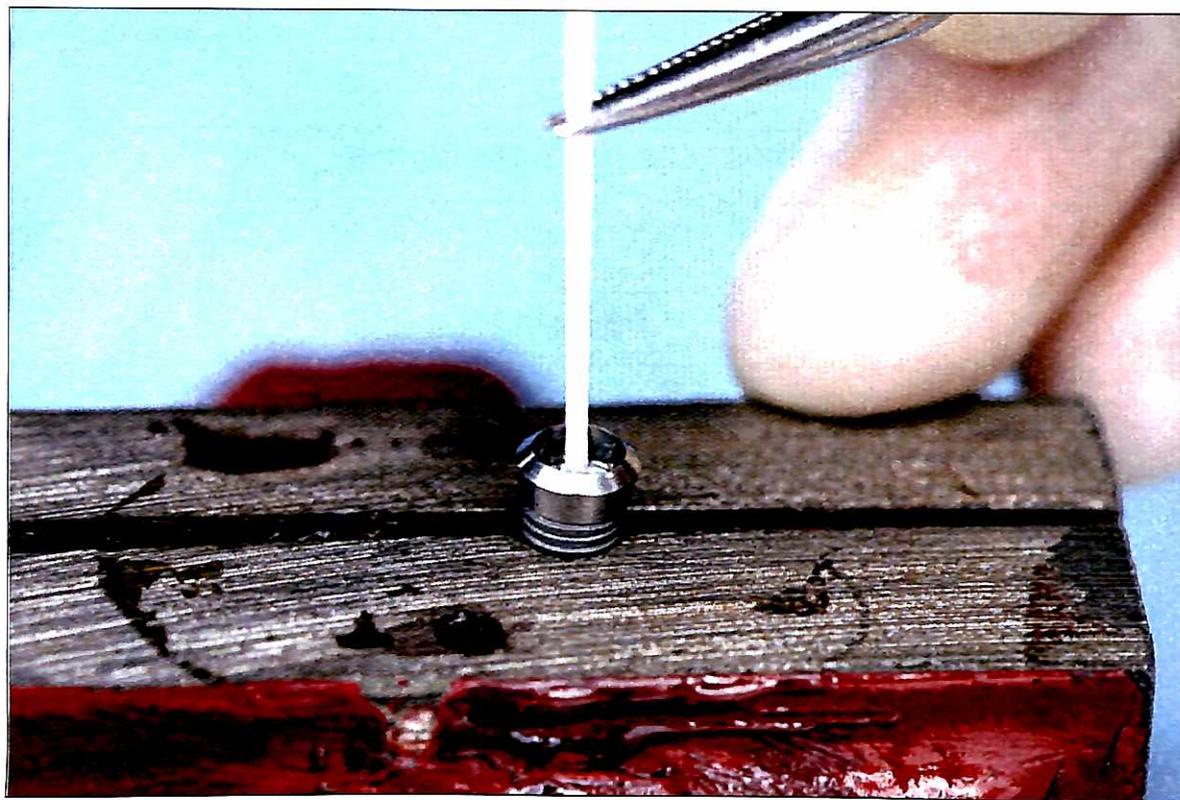
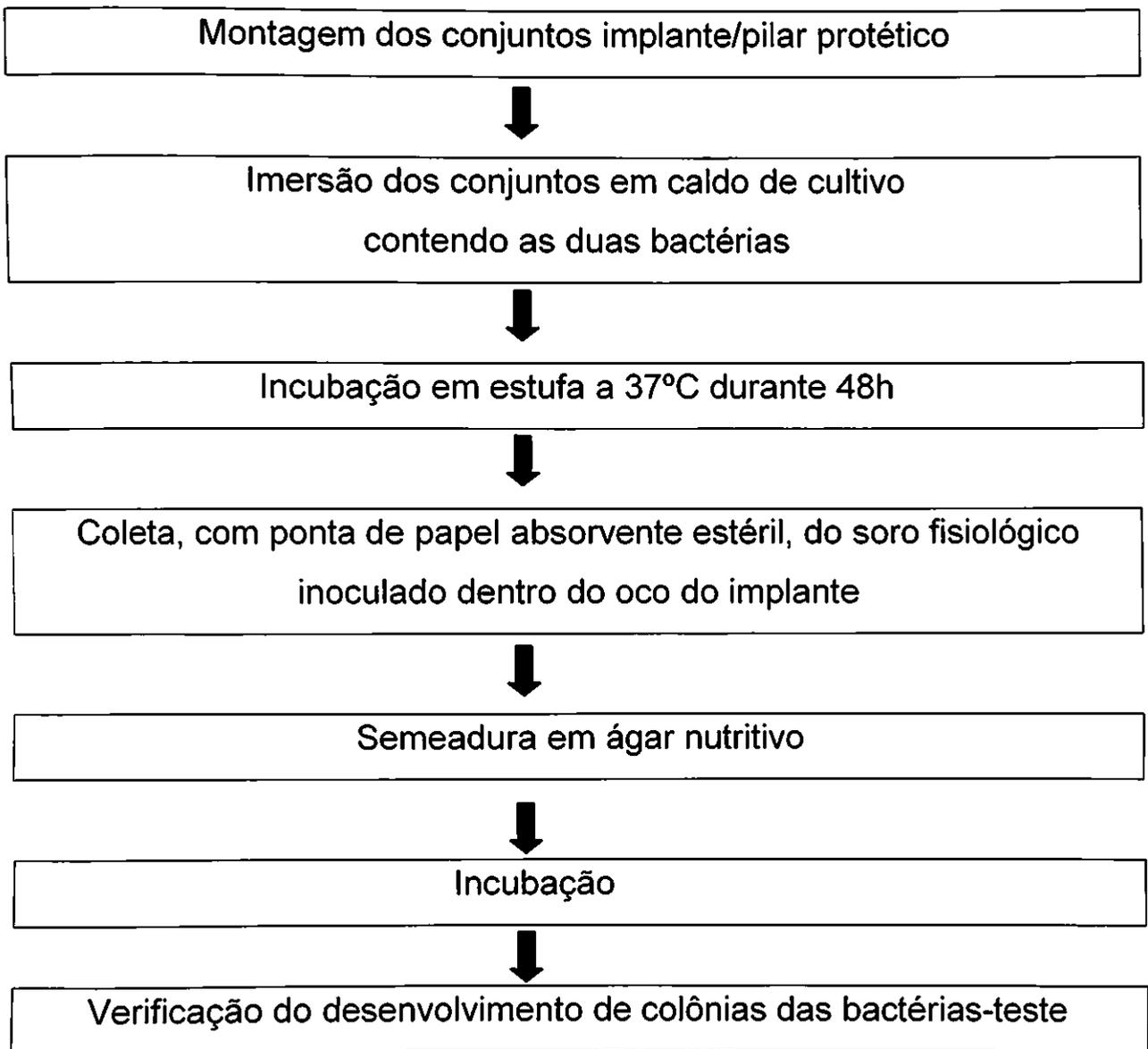


Figura 13 – Coleta do conteúdo do oco do implante com ponta de papel absorvente estéril.

A seqüência desses procedimentos está expressa no Fluxograma 2.

FLUXOGRAMA 2



4.5 Análise da medida do microvalamento interno em microscópio eletrônico de varredura

Nesta fase do experimento, depois de terem sido retirados do meio de cultura onde foi testado o extravasamento de dentro para fora, os 20 implantes utilizados neste teste de infiltração foram esterilizados em autoclave para serem posteriormente manipulados. A primeira tentativa de medição das interfaces foi

frustrada, pois as mesmas se encontravam obliteradas por matéria orgânica, possivelmente meio de cultura e bactérias. Após a desconexão de cada conjunto, foi realizada uma limpeza mecânica pela ação de detergente enzimático e de lavagem em aparelho de ultrassom com água morna. Em seguida, as peças do conjunto foram individualmente autoclavadas a 121^oC durante 20 minutos, novamente conectadas com o torque recomendado pelo fabricante com o cuidado de conectar cada pilar ao seu implante correspondente.

Após este procedimento eles foram levados ao microscópio eletrônico de varredura⁸ do Laboratório de Plasma Térmico do Departamento de Física da Universidade Federal do Espírito Santo. Inicialmente, foi feita uma avaliação da peça como um todo (Figura 14). Em seguida o foco foi direcionado à interface implante/pilar e a visualização executada com aumentos que variaram de 17 (visão geral da interface) a 5000 vezes (detalhe do microvalamento). Em cada interface foram selecionados quatro pontos, onde foram realizadas as mensurações, obtendo-se uma média em cada implante e de cada grupo.

As Figuras 14 a 19 mostram alguns detalhes desses exames.

⁸ Shimadzu® SSX- 550 Superscan Scanning Electron Micros

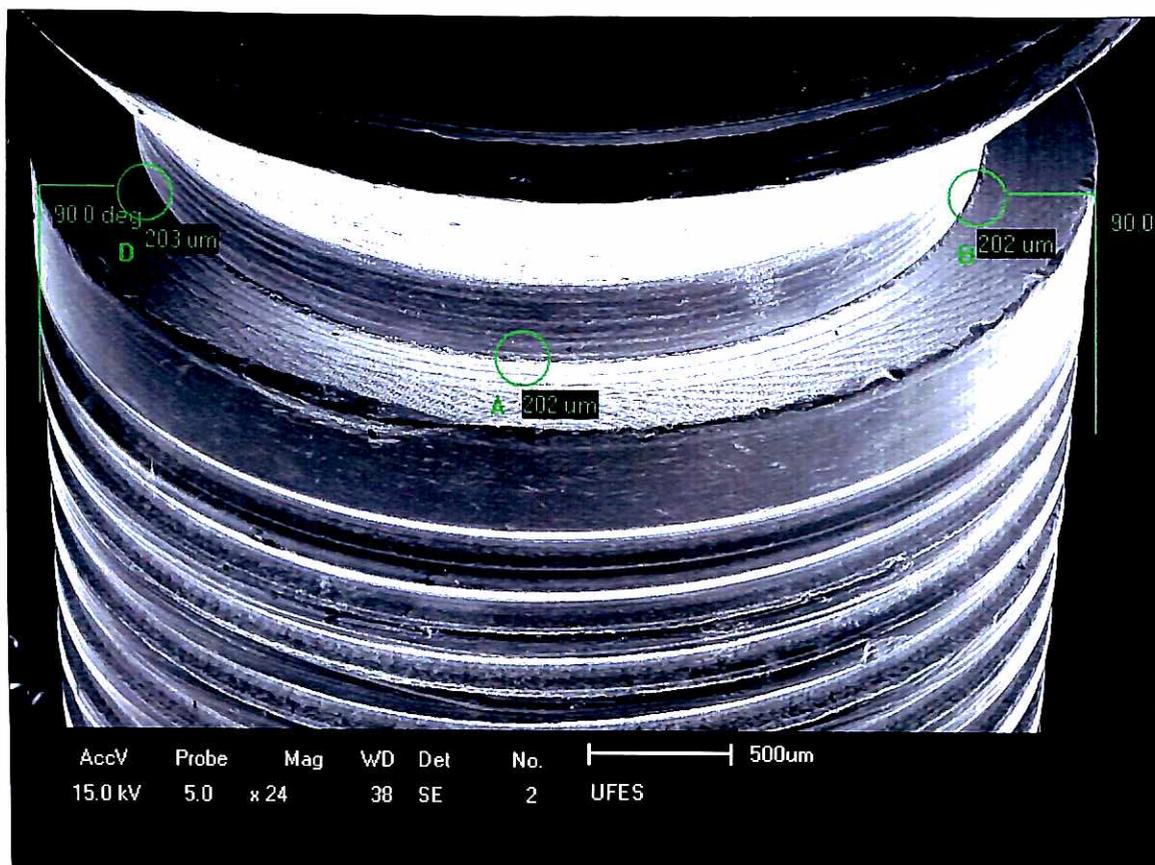


Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura: visão geral do conjunto Conexão®.

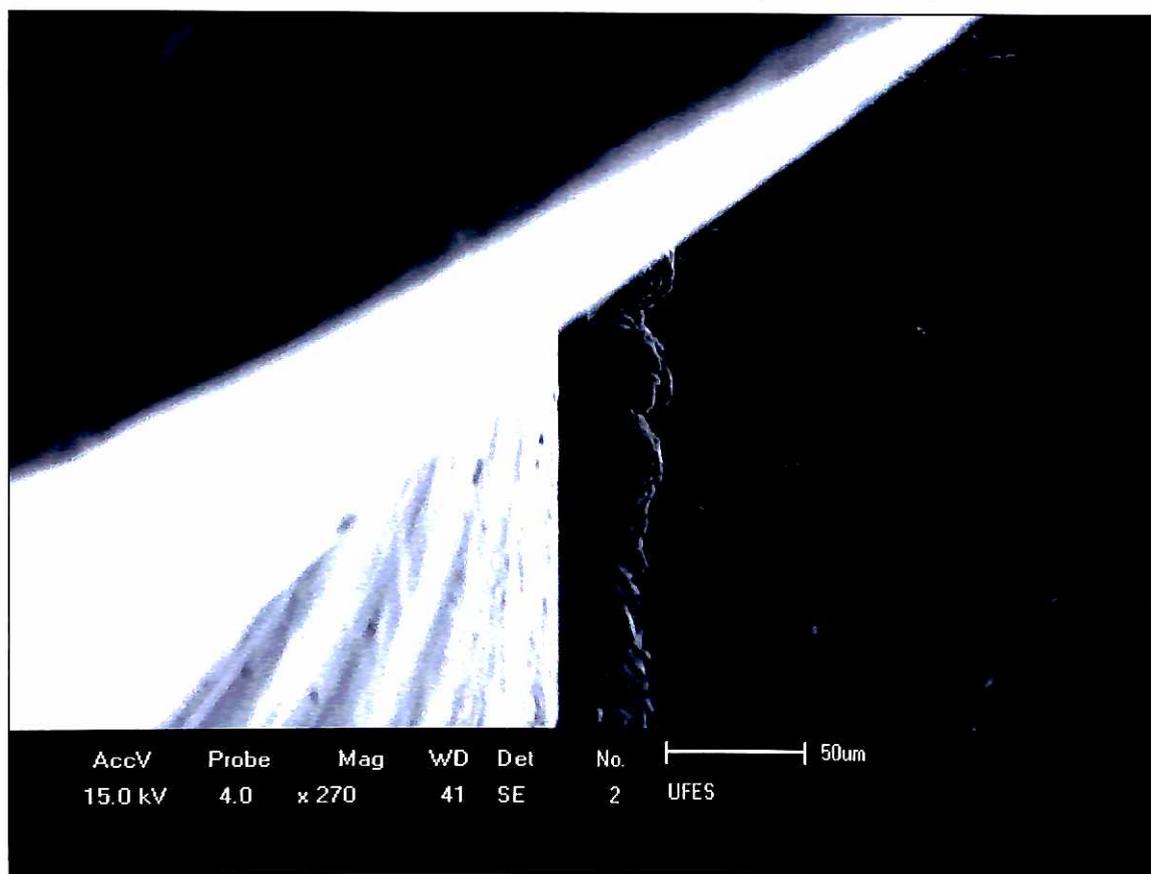


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 270 vezes no local a ser medido.

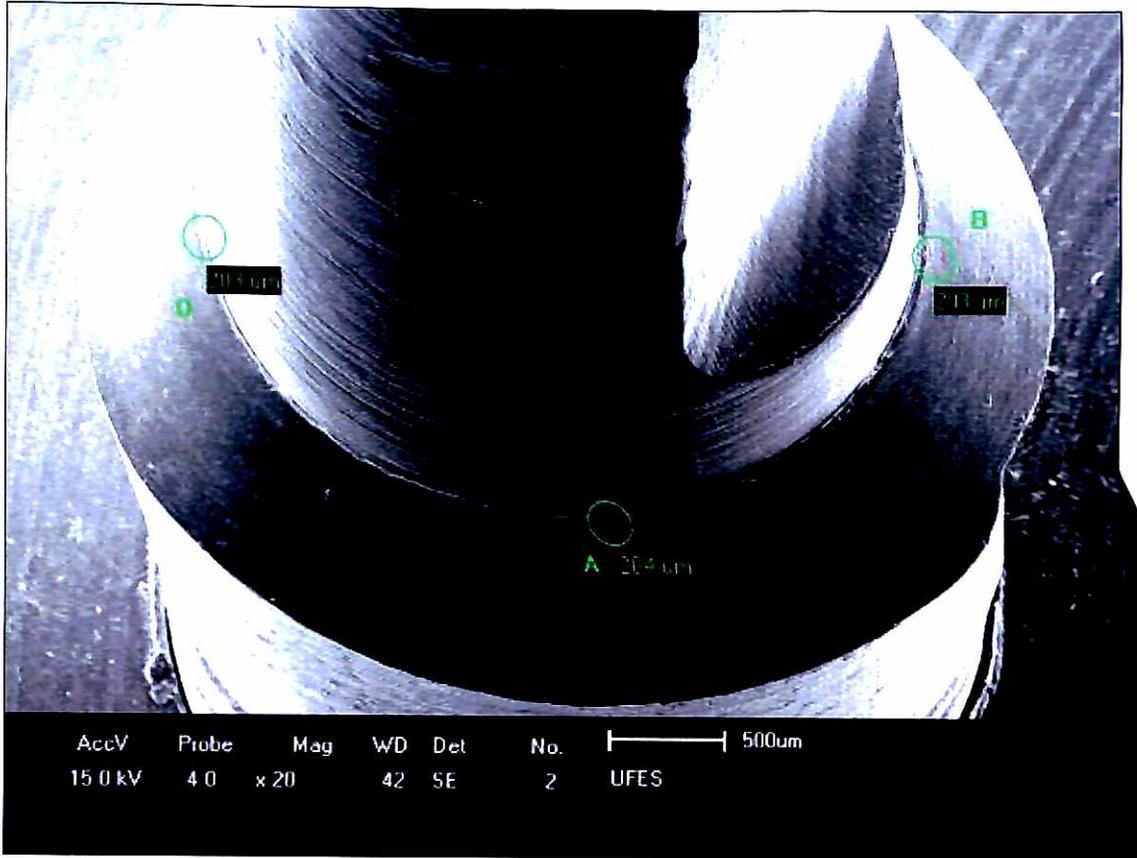


Figura 16 – Microscopia eletrônica de varredura: tomada em 30° do conjunto da Titanium Fix® com um aumento de 20 vezes.

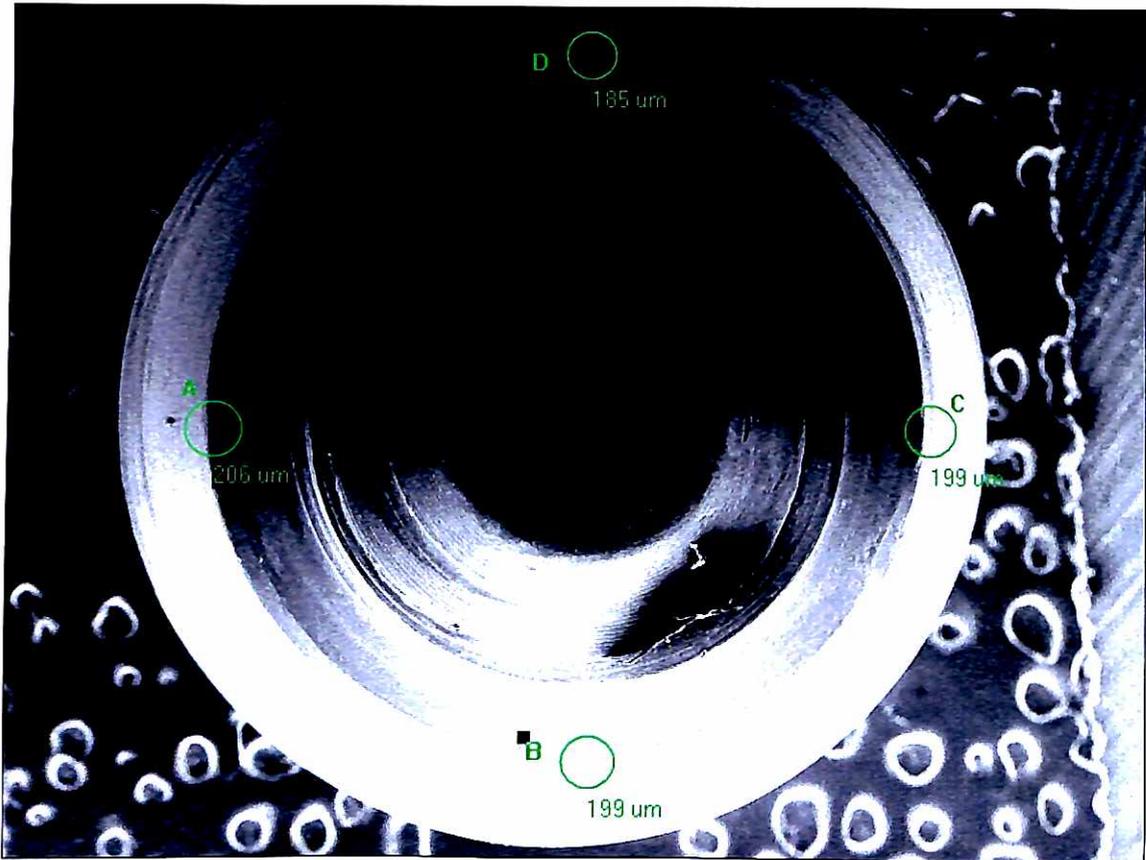


Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura: tomada de cima do conjunto da Titanium Fix®.

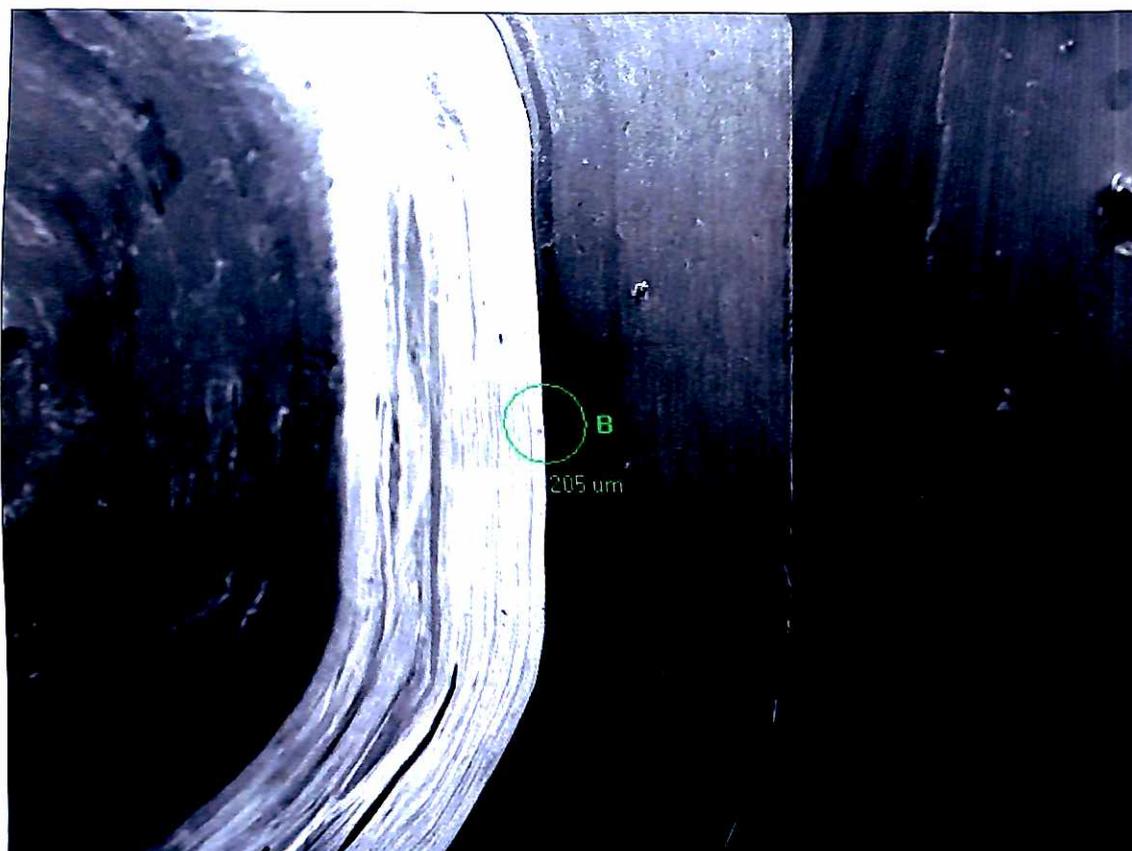


Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura: visão aproximada do conjunto Titanium Fix®.

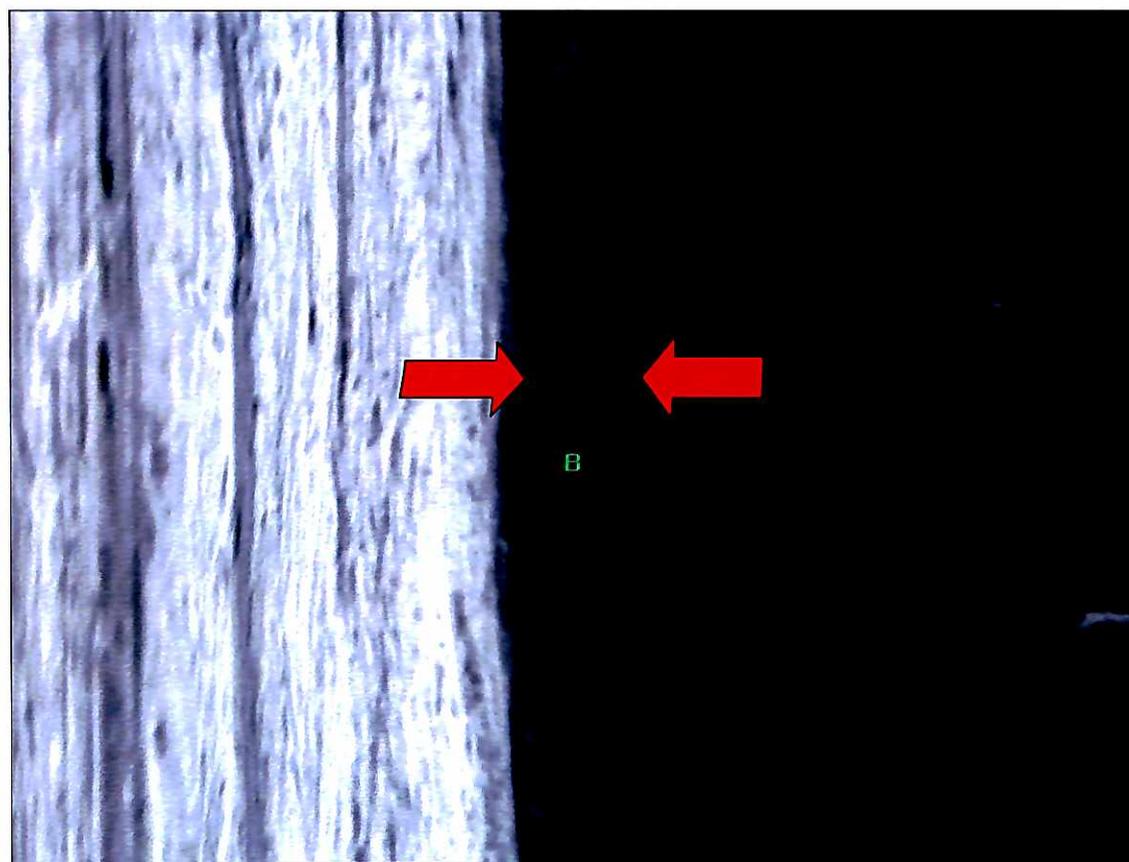


Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura: detalhe do conjunto Titanium Fix®.

4.6 Análise da configuração interna dos conjuntos implante/pilar

Para verificar se a configuração interna dos conjuntos tinha contribuído para a diferença de comportamento entre os grupos na análise da infiltração de dentro para fora um conjunto de cada marca foi selecionado aleatoriamente, incluído em resina (Figuras 20 e 21), desgastado até a metade com um esmeril e polido no torno em todas as direções para a remoção das rebarbas do metal. Após este procedimento, foi levado e examinado no microscópio eletrônico de varredura.

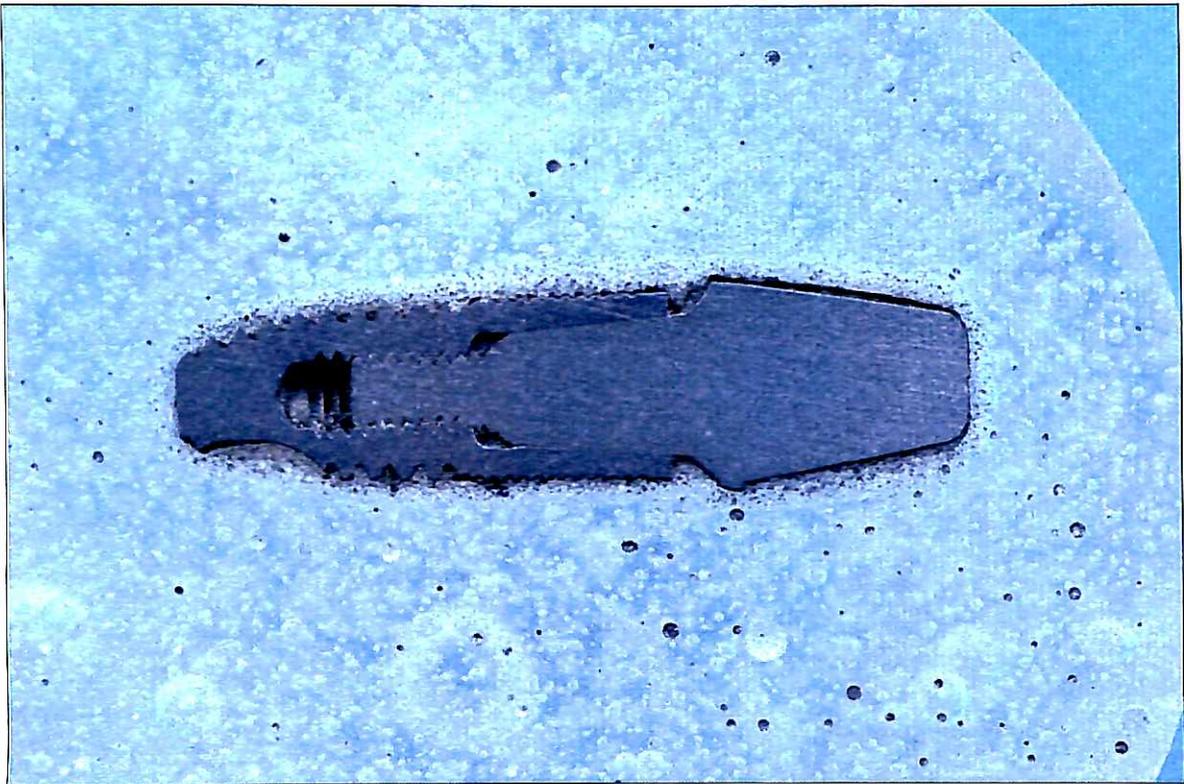


Figura 20 – Configuração interna do conjunto da Conexão® incluído no bloco de resina.

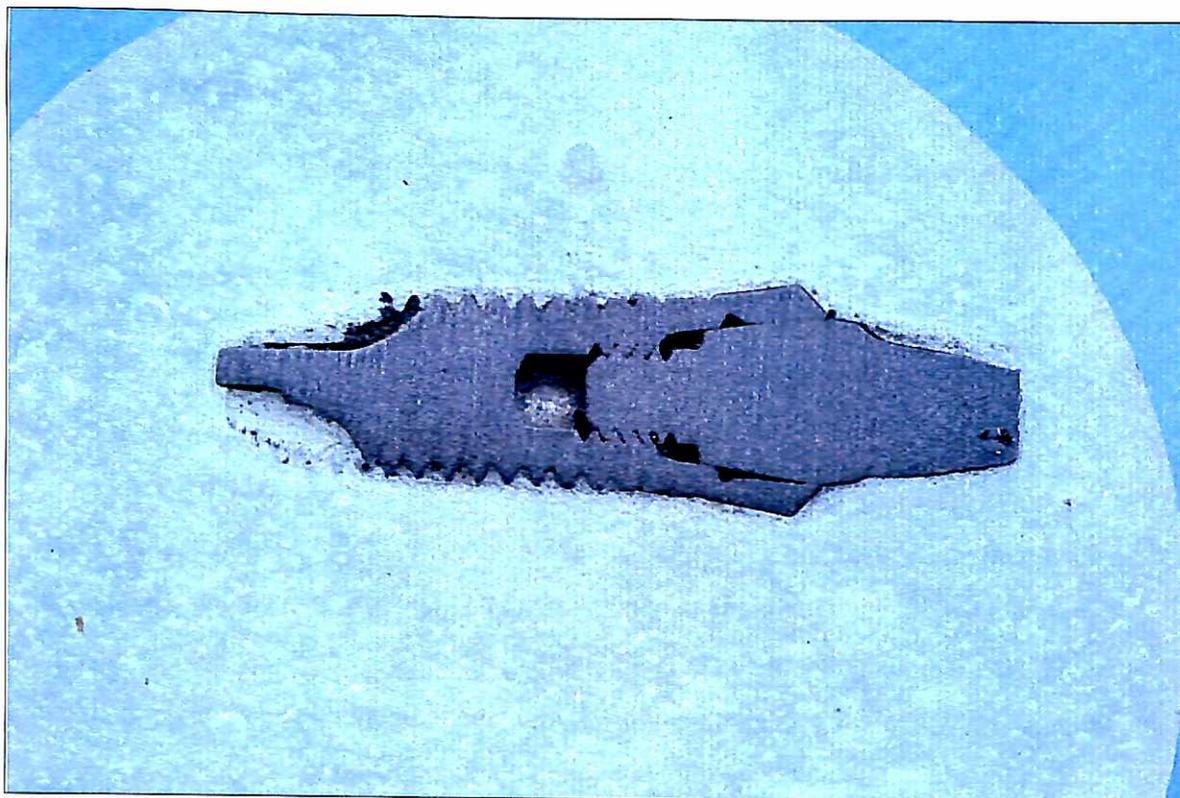


Figura 21 – Configuração interna do conjunto da Titanium Fix® incluído no bloco de resina.

4.7 Análise estatística

A análise estatística constou de duas partes fundamentais.

Na primeira foi avaliada a infiltração bacteriana da interface implante/pilar das duas marcas testadas para o meio externo. Para tanto, foi utilizado o teste exato de Fisher para um nível de significância de 5%.

Na segunda, foi utilizado o teste t para analisar os dados obtidos na mensuração das dimensões dos microvalamentos de ambos os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da infiltração bacteriana da interface implante/pilar para o meio externo

Na avaliação deste quesito foi descartado um implante Titanium Fix[®] em que foi constatada turvação do caldo BHI devido à contaminação da parte externa no ato da inoculação da suspensão bacteriana.

Assim, pudemos observar que ocorreu turvação (Figura 26) nos caldos BHI em que haviam sido colocados nove dos dez (9/10) conjuntos de conexão cônica Conexão[®] e, na realidade, nos quatro dos nove (4/9) conjuntos Titanium Fix[®] analisados, cujos espaços internos tinham sido contaminados com suspensão de *E. coli* e *S. epidermidis*. A semeadura em BHIA confirmou a presença das bactérias-teste nos casos positivos e a ausência nos negativos.

No teste exato de Fisher para um nível de significância de 5%, o valor P foi igual a 0,0495, o que indica uma diferença significativa entre os níveis de infiltração através da interface entre os implantes das duas marcas testadas.

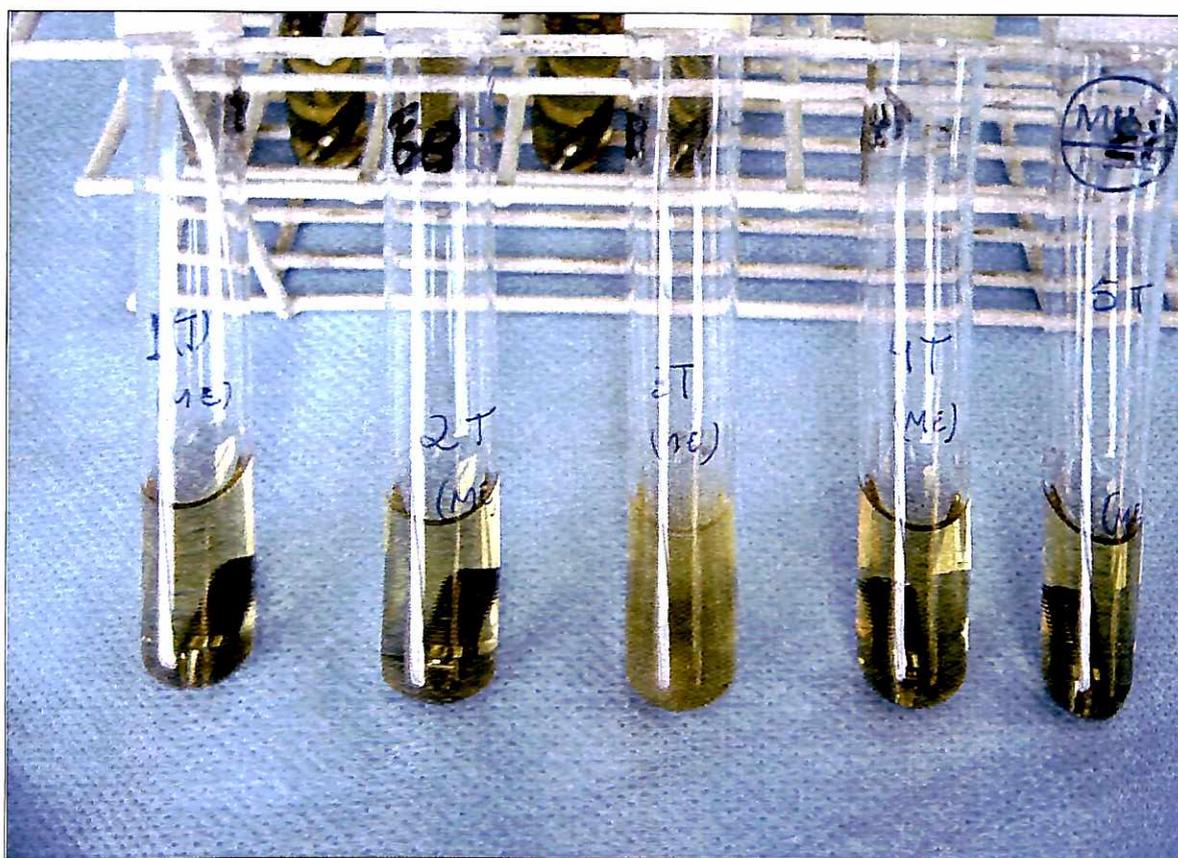


Figura 22 – Turvação do caldo BHI em que foi semeado o conjunto 3T da Titanium Fix[®].

5.2 Análise da infiltração bacteriana do meio externo para a interface implante/pilar

Foi constatada a presença das bactérias-teste no material coletado do interior de todos (20/20) os implantes das duas marcas testadas (Figura 23).



Figura 23 – Desenvolvimento bacteriano, em BHI, observado nas pontas coletoras de material do interior oco dos implantes.

Os resultados globais das análises microbiológicas estão condensados na Tabela 2.

Tabela 2 - Positividades dos testes de infiltração bacteriana no micro-espaco de 20 implantes de conexão cônica das marcas Conexão® e Titanium Fix® fabricadas no Brasil.

Marca	Infiltração Bacteriana da Interface Implante/pilar para o Meio Externo	Infiltração Bacteriana do Meio Externo para a Interface Implante/Pilar
Conexão®	9/10	10/10
Titanium Fix®	4/09	10/10

5.3 Análise da medida do microvalamento interno em microscópio eletrônico de varredura

Nas Figuras de 24 a 27 podemos verificar alguns detalhes dessas medições.

Os dados da Tabela 3 demonstram que as medidas das larguras dos microvalamentos variaram muito entre os conjuntos de um mesma marca e entre os quatro pontos de um mesmo conjunto. Por outro lado, com certa frequência observamos que quando um microvalamento era pequeno ou mesmo inexistente em um ponto, do lado oposto era bem maior, o que parecia ocorrer em função de uma excentricidade no momento do parafusamento. No nosso entendimento, uma vez que havia contato de um passo de rosca de um lado, isso não se dava uniformemente nos quatro lados, fazendo com que as medições fossem bastante variáveis entre os pontos.

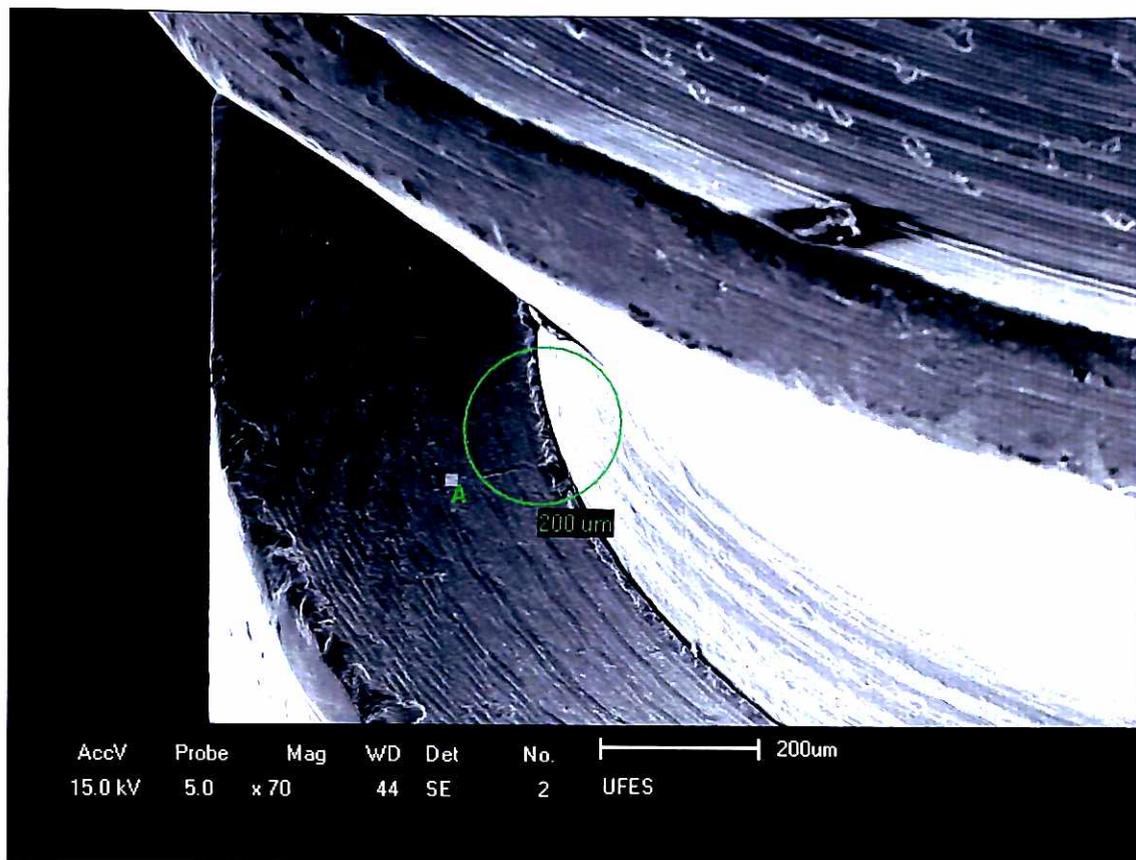


Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 70 vezes em um dos pontos a serem medidos, em 90° .

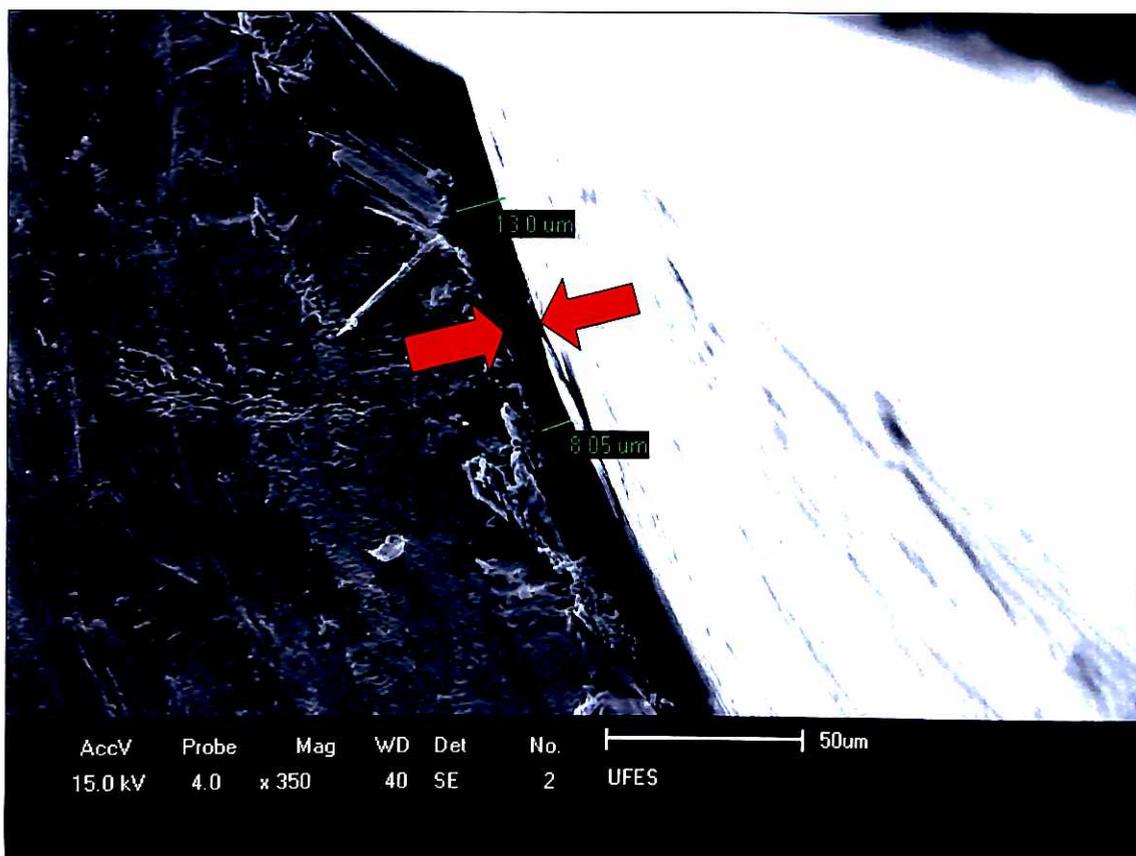


Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura: aumento de 350 vezes em um dos pontos a serem medidos.

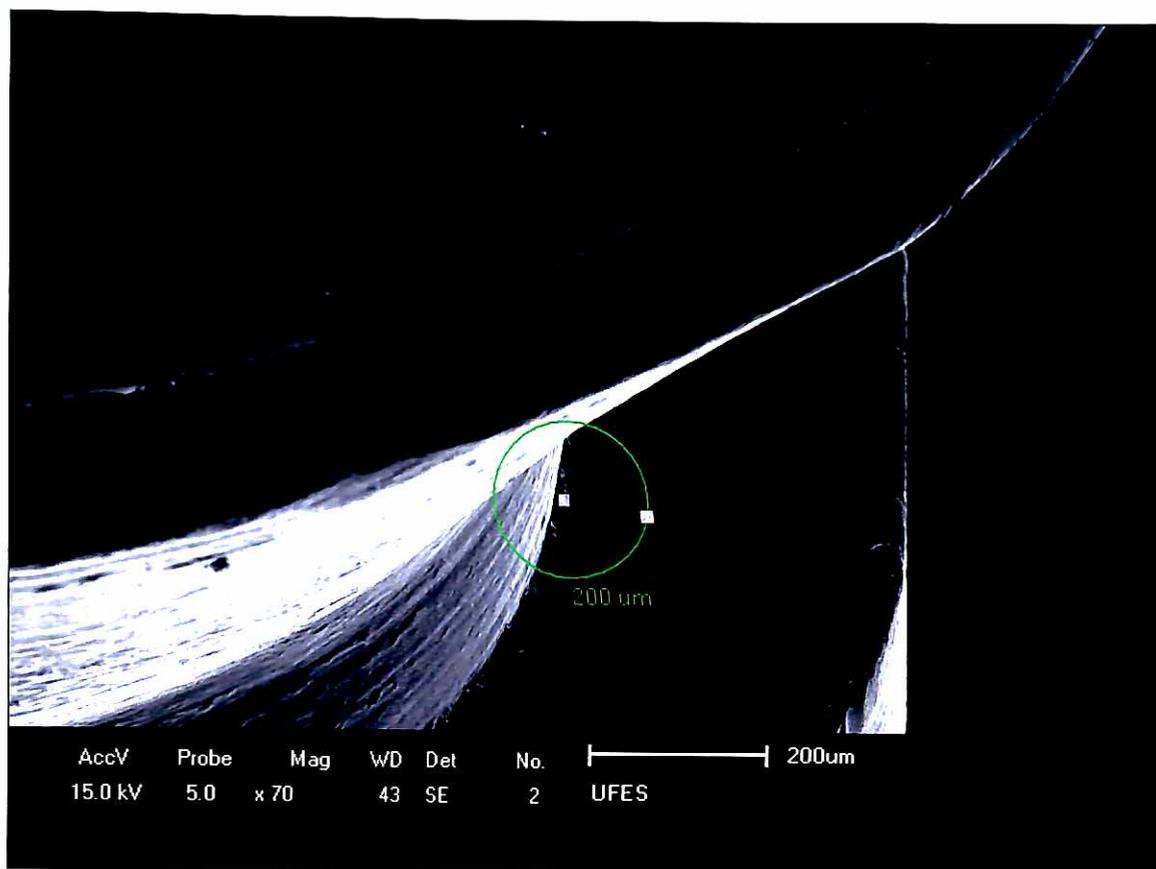


Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura: região em 90° do lado oposto.

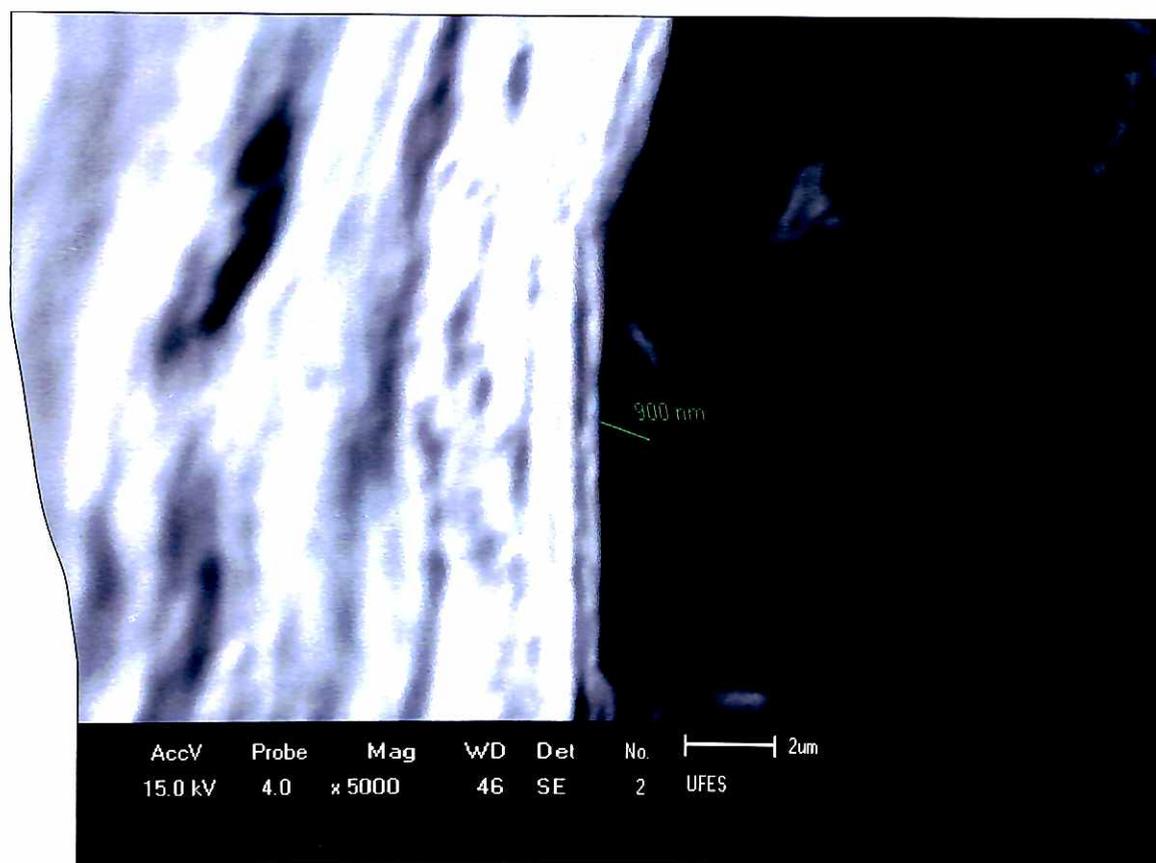


Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura: aproximação máxima (aumento de 5.000 vezes) utilizada em um dos pontos a serem medidos.

Tabela 3 – Resultado da medida das interfaces implante/pilar com conexão cônica das marcas Conexão® e Titanium Fix® no microscópio eletrônico de varredura, em quatro locais de cada conjunto (A, B, C e D) com as respectivas médias.

AMOSTRA	A	B	C	D	Média
1C	4,95	3,75	0,10	1,57	2,59
2C	2,78	2,70	1,41	4,73	2,91
3C	1,64	2,72	1,07	0,00	1,36
4C	2,75	0,40	0,92	4,74	2,20
5C	3,75	4,04	0,10	2,46	2,59
6C	2,56	1,00	0,00	0,00	0,89
7C	4,28	5,51	5,32	1,12	4,06
8C	4,51	3,87	5,59	13,00	6,74
9C	1,82	1,55	1,71	1,82	1,73
10C	0,68	9,18	21,00	5,73	9,15
1T	7,08	4,92	4,69	3,20	4,97
2T	5,95	5,35	6,15	4,51	5,49
3T	6,38	2,60	5,63	4,58	4,80
4T	3,60	3,20	5,94	2,36	3,78
5T	1,73	3,93	4,74	6,79	4,30
6T	3,06	0,00	2,53	5,50	2,77
7T	4,94	1,35	4,69	2,41	3,35
8T	0,00	1,07	2,19	0,56	0,96
9T	4,47	4,06	4,19	2,01	3,68
10T	1,84	1,44	1,29	2,48	1,76

Na Tabela 4 são encontrados os resultados relativos à análise estatística, pelo Teste t, das dimensões dos microvalamentos presentes nos implantes de conexão cônica das duas marcas testadas.

Tabela 4 - Análise estatística das dimensões dos microvalamentos dos dois sistemas testados – Teste t.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Conexão®	Titanium Fix®
Média	3,42	3,59
Variância	6,77	2,06
Desvio Padrão	2,60	1,43
Observações	10	10
Variância agrupada		4,413
Gl		18
Stat t		-0,175
P(T<=t) uni-caudal		0,431
t crítico uni-caudal		1,734
P(T<=t) bi-caudal		0,863
t crítico bi-caudal		2,101

De acordo com os dados dessa tabela, o valor $p = 0,863$ foi maior que o nível de significância estabelecido em 0,05, o que nos leva a concluir que não existe

diferença significativa entre as dimensões dos microvalamentos entre implantes/ pilares protéticos do sistema Conexão[®] (média de 3,42 μm) e Titanium Fix[®] (média de 3,59 μm).

A média dos valores dos microvalamentos dos dois sistemas testados está demonstrada no Gráfico 1.

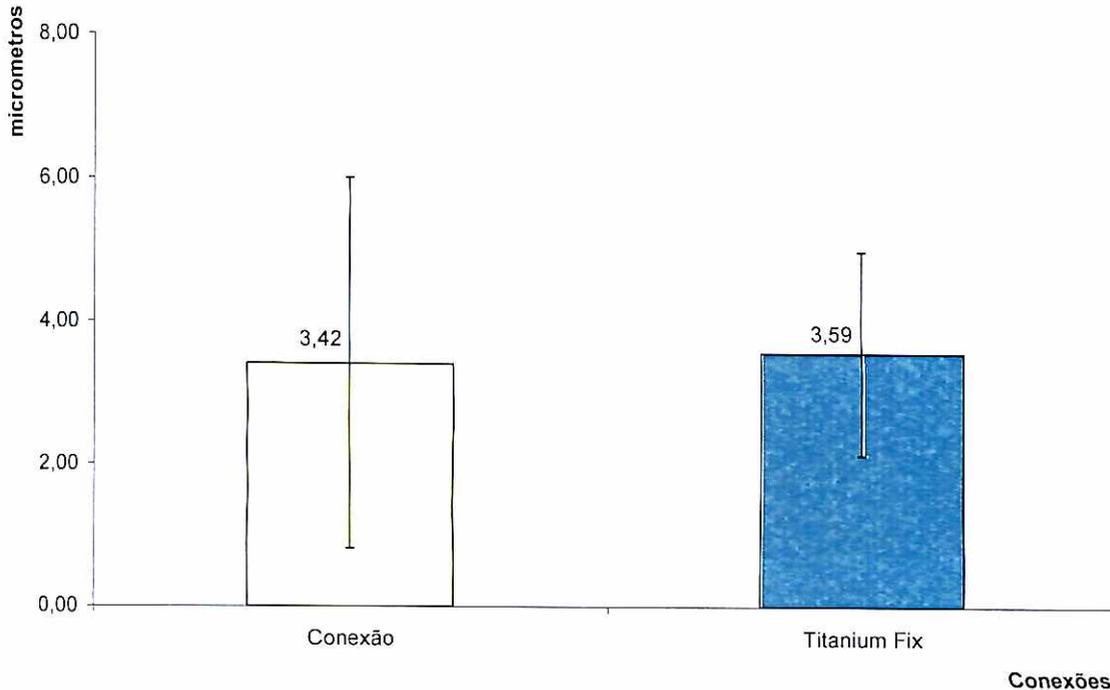


Gráfico 1 – Demonstração da média dos valores, em μm , dos microvalamentos dos dois sistemas testados.

5.4 Análise da configuração interna dos conjuntos no microscópio eletrônico de varredura

Nas Figuras 28 a 37 colocamos algumas imagens do exame, em microscópio eletrônico de varredura, da configuração interna dos conjuntos.

Essa análise permitiu-nos verificar a existência de irregularidades em relação às superfícies em contato em ambas as marcas estudadas, de um lado em relação ao outro. Quanto às roscas dos parafusos, os conjuntos Conexão[®] mostraram um microvalamento maior e os Titanium Fix[®], em alguns passos de roscas, mostraram como se tivesse havido, em algumas áreas, a eliminação do microvalamento. Esta ocorrência talvez tenha sido provocada pela força de torque que levou a uma força de tração para cima que associada a irregularidades da rosca promoveu quase que um *amassamento desta superfície contra o passo de rosca imediatamente superior a ela*.

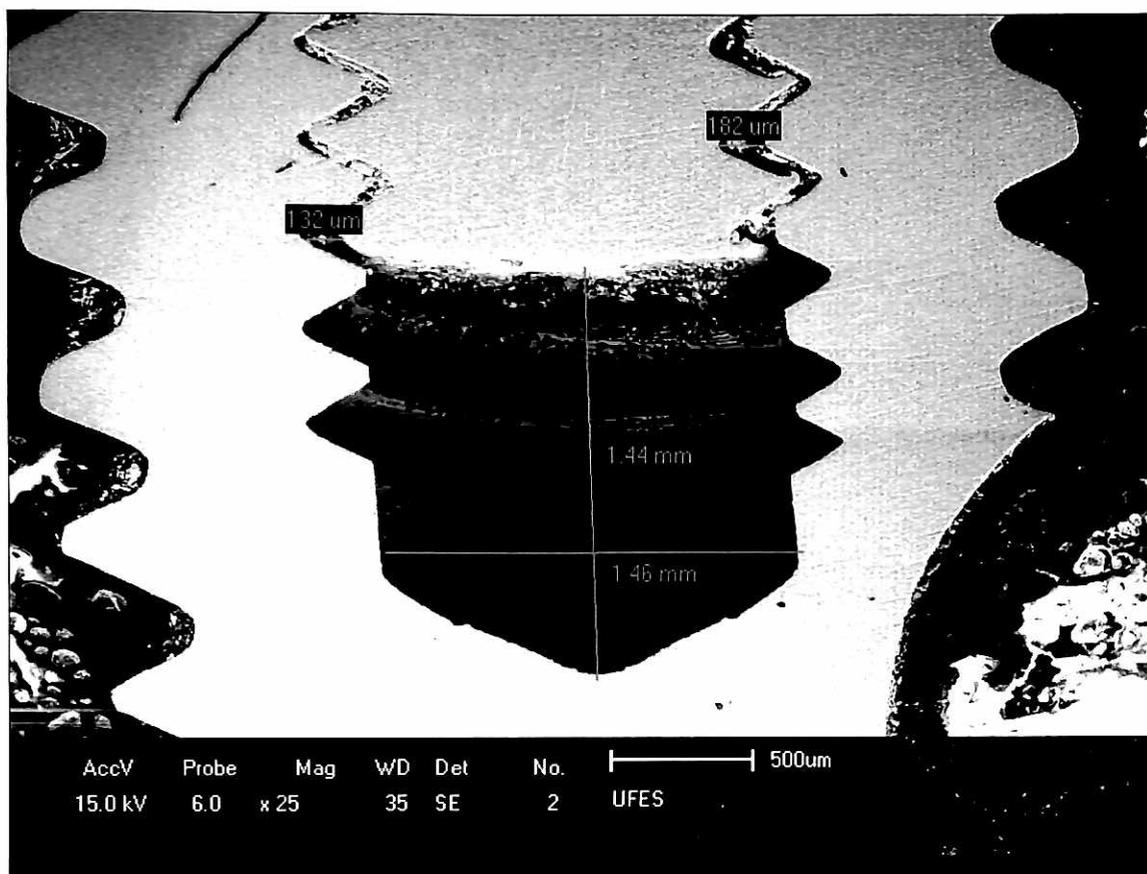


Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura: vista e dimensões da parte final do oco do implante da Conexão®.

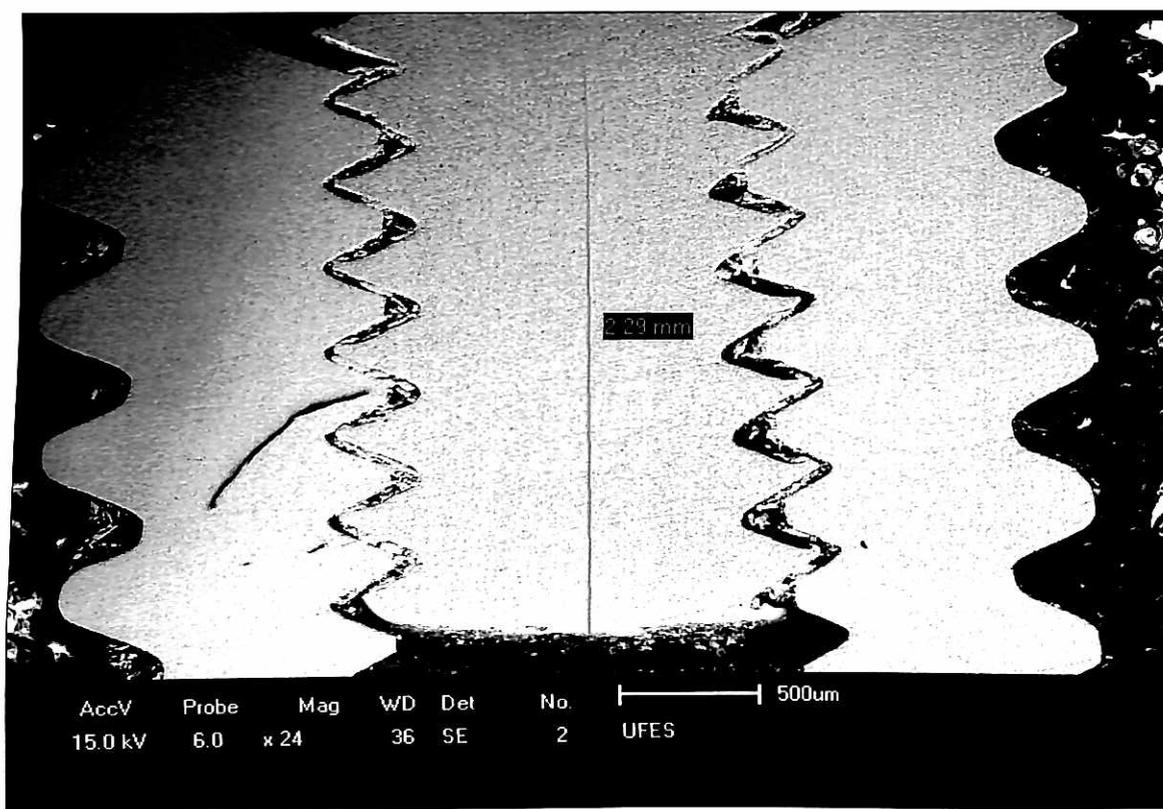


Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida da extensão do parafuso da Conexão® que penetra no oco do implante.

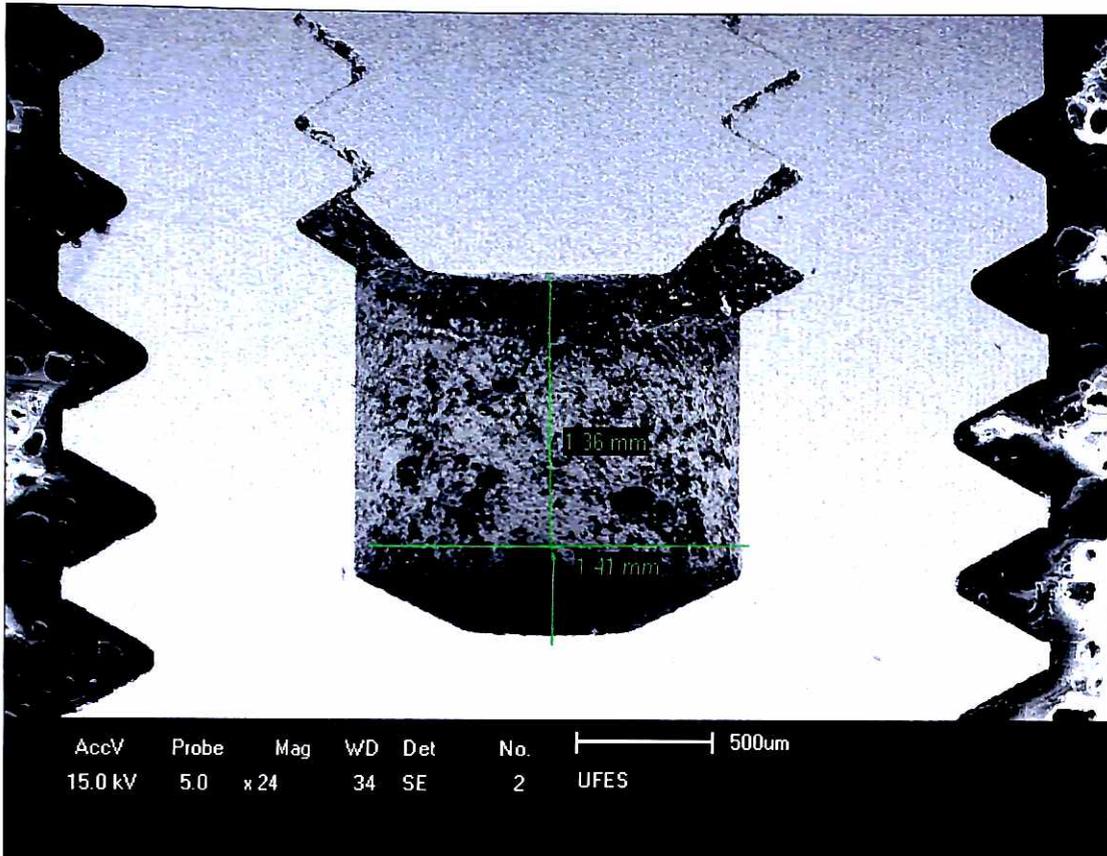


Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida da parte final do oco do implante da Titanium Fix®.

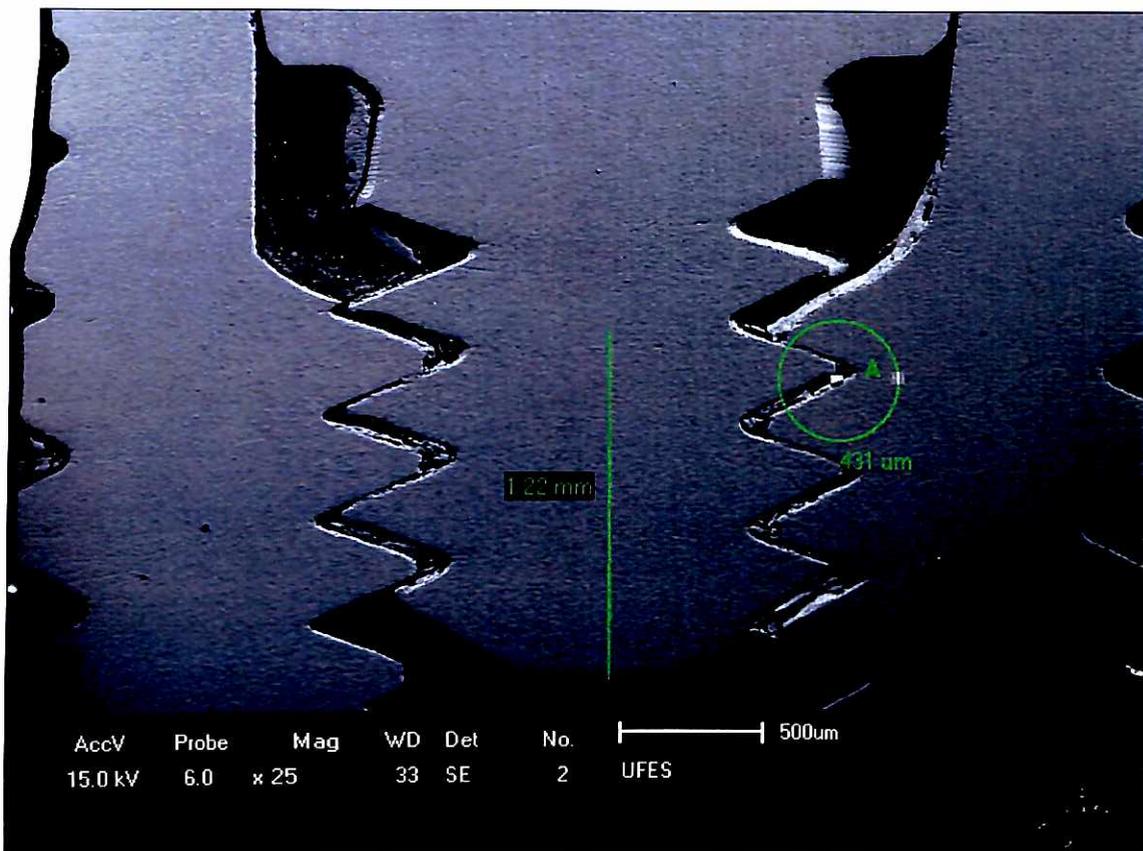


Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura: vista da extensão do parafuso do conjunto Titanium Fix® que penetra no oco do implante.

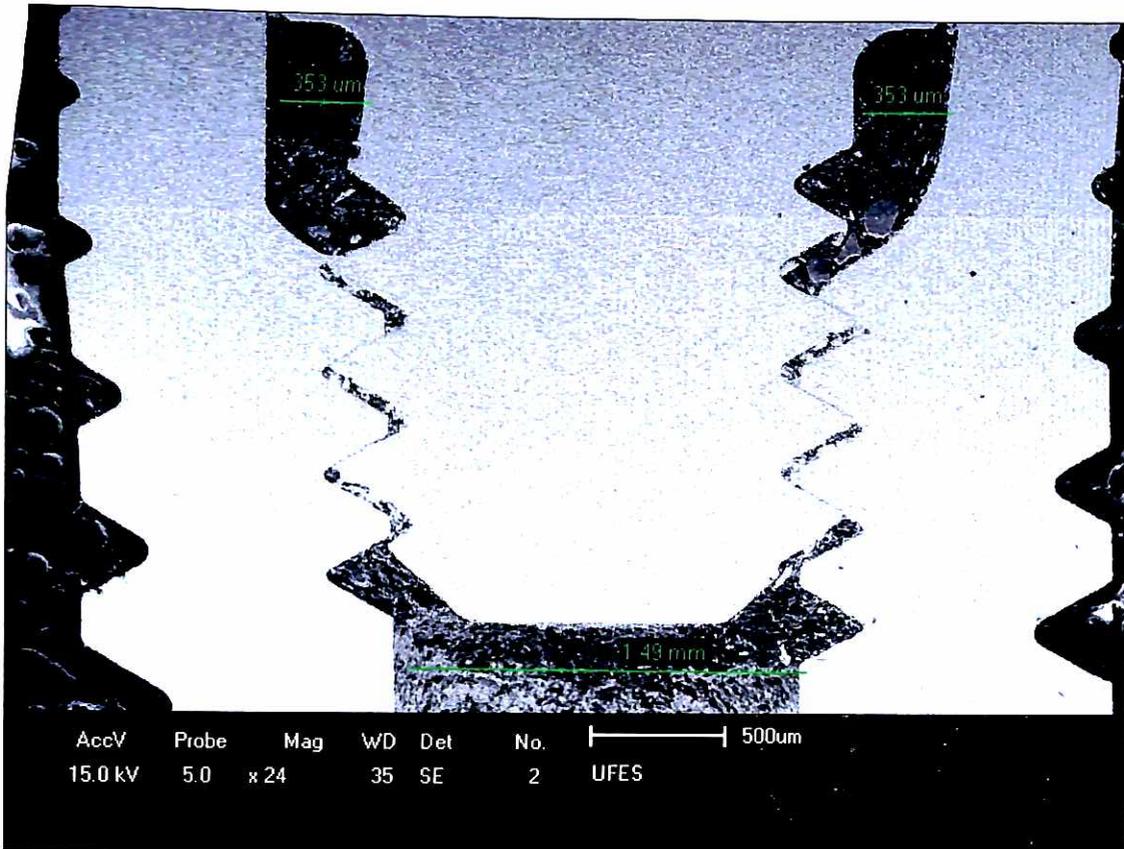


Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura: vista da área de compressão com medições de espaços internos.

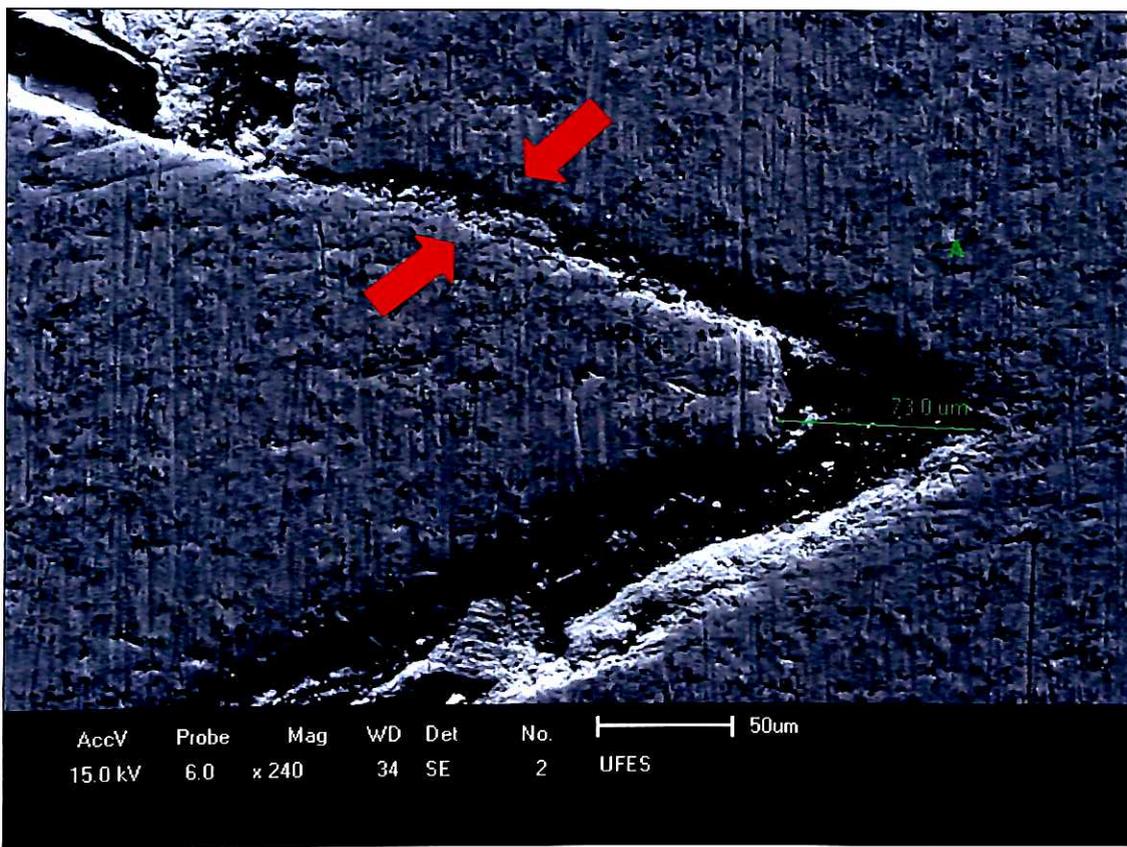


Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura: detalhe da compressão do passo de rosca sobre a parte superior.

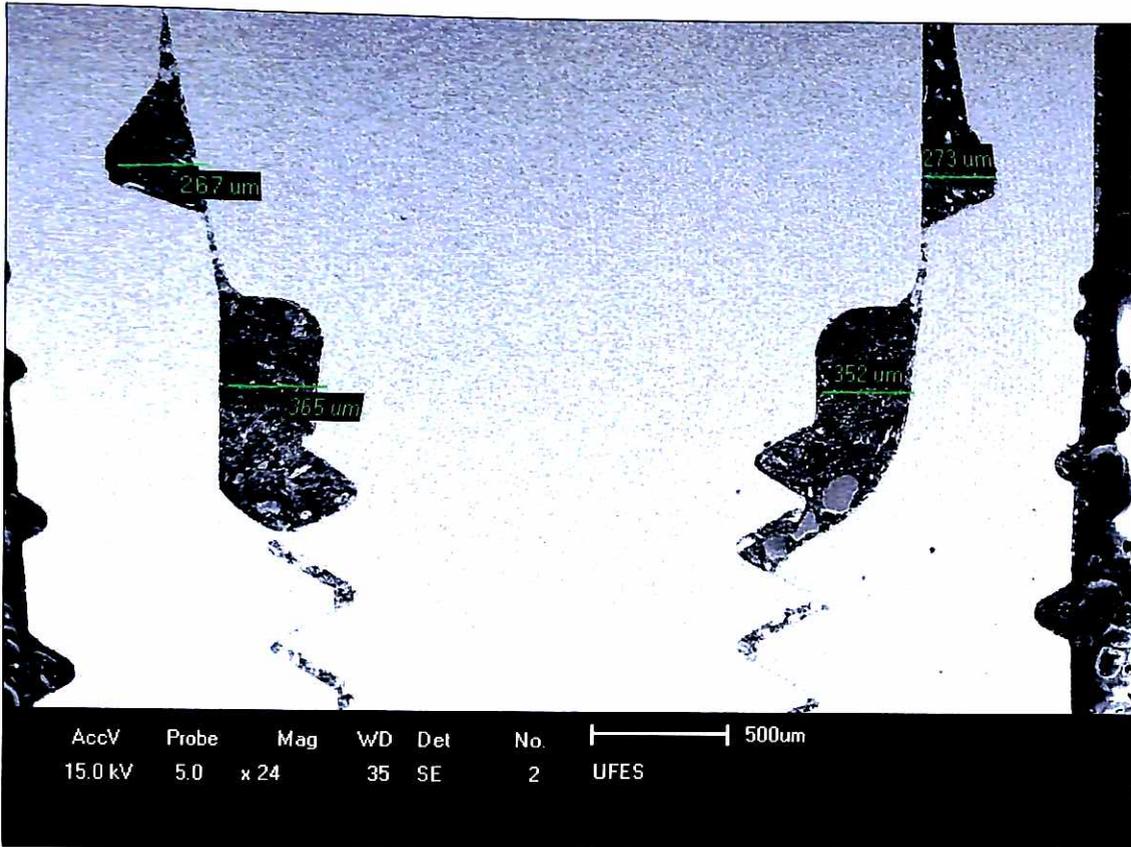


Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura: vista e medidas dos espaços internos do conjunto Titanium Fix®.

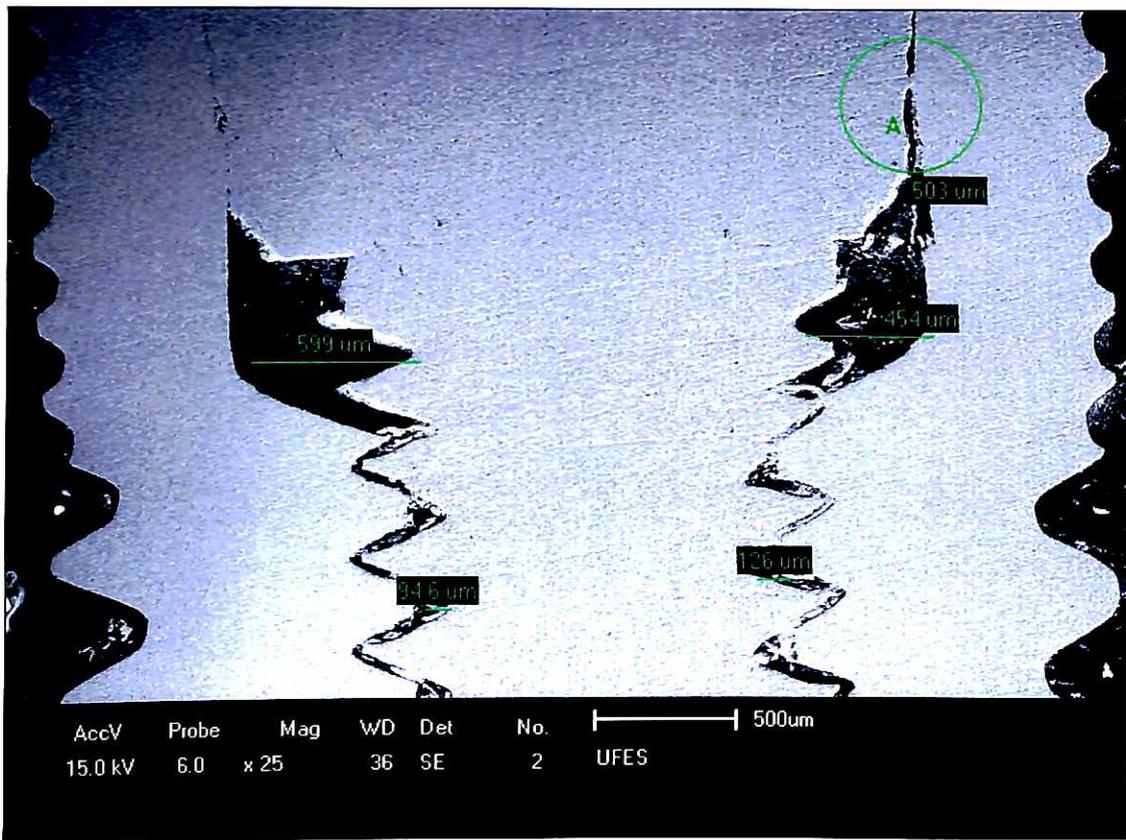


Figura 35 – Microscopia eletrônica de varredura: vista e medida dos espaços internos do conjunto da Conexão®.

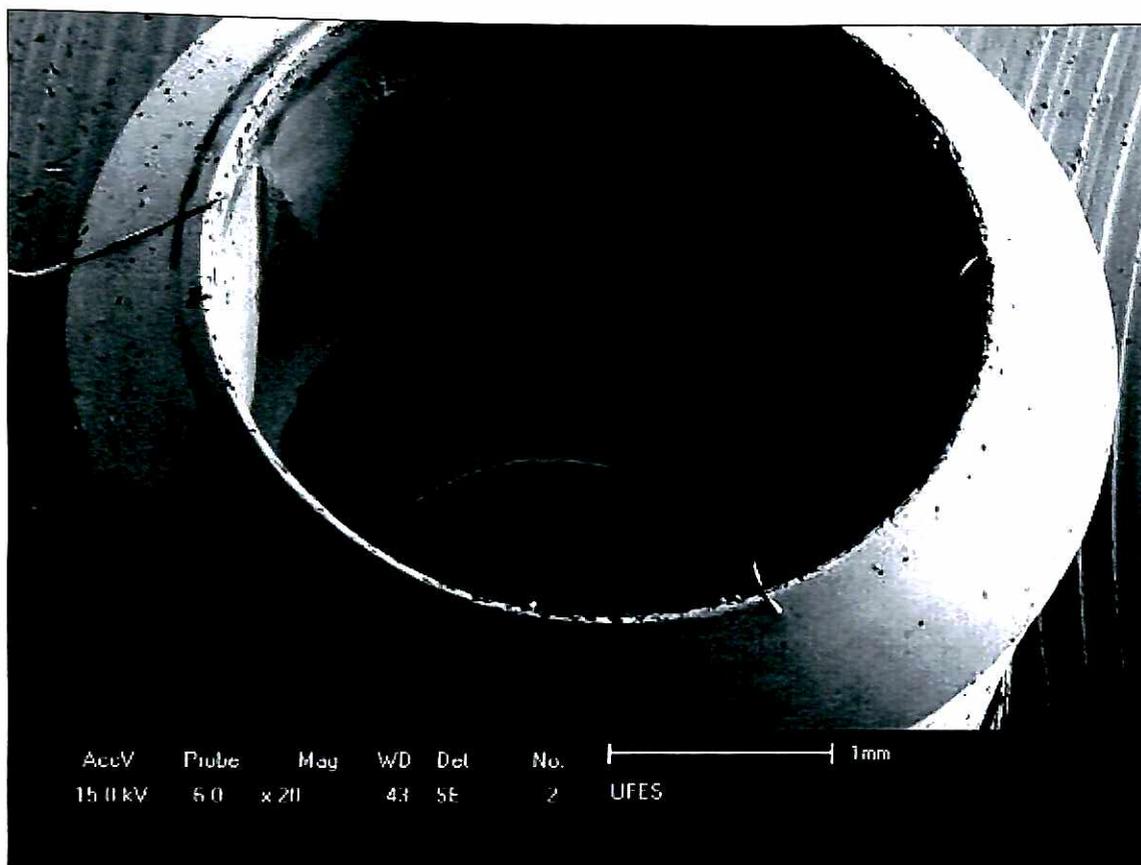


Figura 36 – Microscopia eletrônica de varredura: vista em 30° do oco do conjunto Titanium Fix®.

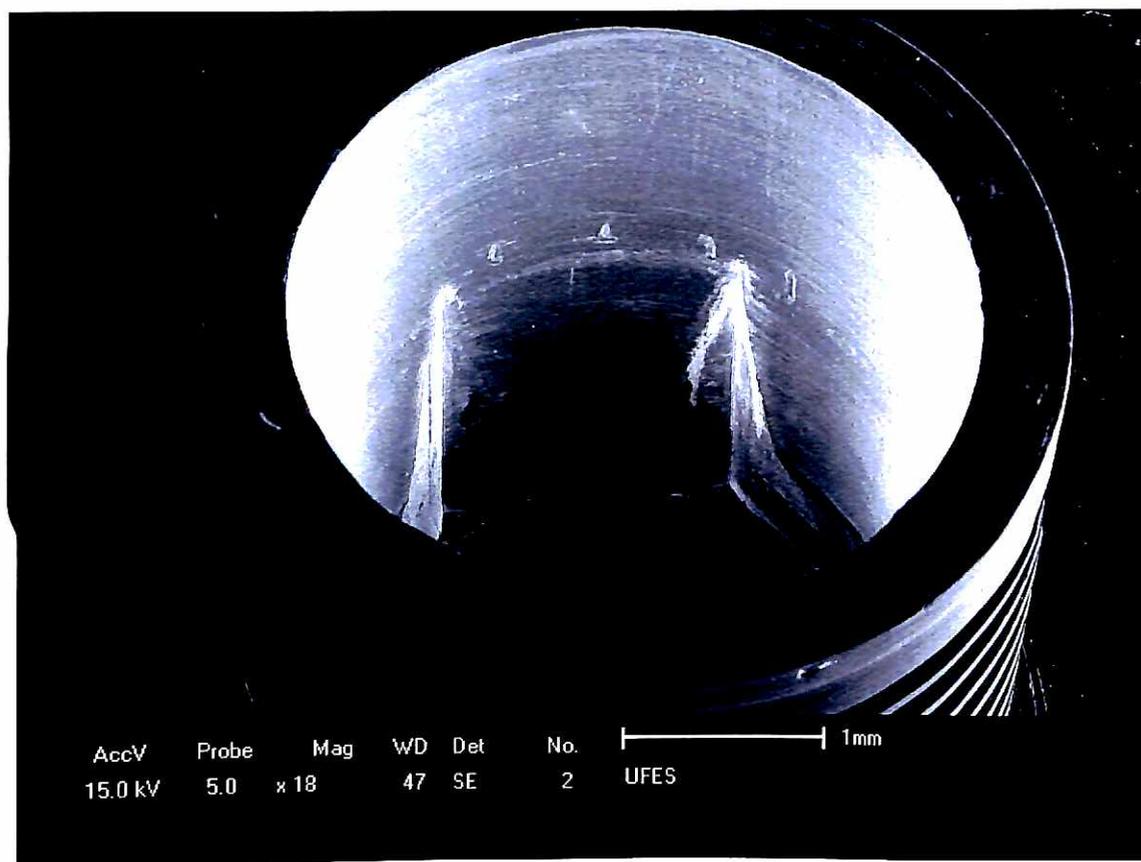


Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura: vista em 30° do oco do conjunto da Conexão®.

6 DISCUSSÃO

O grau de penetração bacteriana entre os componentes de um implante presumivelmente é uma condição multifatorial que depende da precisão de adaptação entre ele e o pilar protético, do grau dos micromovimentos entre os componentes e da força de torque usada para conectá-los. Durante a função, forças oclusais transversas que incidem na restauração protética podem induzir torções ou micromovimentos internos que fazem aumentar o microvalamento existente na interface dos componentes e produzir um efeito de bombeamento entre o interior do implante e os tecidos perimplantares (STEINEBRUNNER et al., 2005). Desta forma, as bactérias que se infiltraram podem voltar a colonizar esses tecidos e as patogênicas podem levar ao risco de doença.

É importante ressaltar que mesmo que um sistema de conexão não permita a infiltração de bactérias contidas no biofilme que circunda o implante, poderá haver, no espaço entre o conector e o implante, a instalação de bactérias do meio ambiente bucal se não forem tomadas medidas adequadas de assepsia e antissepsia no ato de colocação do conector. Muitas das espécies bacterianas que compõem a microbiota bucal são dotadas de eficientes mecanismos de adesão não só aos nossos tecidos, mas também a materiais neles inseridos (DE LORENZO, 2004).

Neste estudo testamos a ocorrência de infiltração bidirecional de uma suspensão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* na interface entre implantes e pilares de conexão cônica de duas marcas produzidas no Brasil: Conexão® e Titanium Fix®. A infiltração da interface para o meio externo foi constatada em nove dos dez implantes da Conexão® e em quatro dos nove da Titanium Fix®; a contabilização de menor número de amostras (nove) do sistema Titanium Fix® ocorreu porque um de seus conjuntos foi descartado porque constatamos a contaminação da parte externa no ato de inoculação da suspensão das bactérias em seu interior. A ocorrência de infiltração do meio externo para a interface foi observada em todos os 20 implantes testados, independentemente da marca.

Conforme analisamos na Revisão da Literatura, utilizando diferentes sistemas de implantes e a identificação bacteriana por técnicas dependentes de cultivo ou por testes moleculares, vários pesquisadores relataram a infiltração de

bactérias nesse micro-espço de outros sistemas de conexão. Alguns utilizaram metodologia *in vitro* (AMARAL, 2003; BARBOSA, 2006; CRAVINHOS, 2003; CURY et al., 2006; DUARTE et al., 2006; GROSS; ABRAMOVICH; WEISS, 1999; GUINDY et al., 1998; JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; PIATELLI et al., 2001; PROFF et al., 2006; QUIRYNEN et al., 1994; STEINEBRUNNER, 2005; TRAVERSY; BIREK, 1992) e, outros, *in vivo* (CALLAN; O'MAHONY; COBB, 1998; CALLAN; COBB; WILLIAMS, 2005; COVANI et al., 2006; FERRARI, 2004; HEIDENRIJK et al., 2006; KELLER; BRAGGER; MOMBELLI, 1998; OLIANI, 2004; ORSINI et al., 2000; PERSSON et al., 1996; QUIRYNEN; VAN STEENBERGHE, 1993; RIMONDINI et al., 2001; SARTORI, 2006; SENNERBY; LEKHOLM, 1993).

No entanto, o levantamento da bibliografia especializada nos permitiu localizar somente duas pesquisas cujo escopo foi o de testar se os implantes com conexão cônica permitem *in vitro* essa infiltração: a publicada em 1997 por Jansen; Conrads e Richter e a publicada recentemente por Dibart et al. (2005). Por esse motivo, na realidade, os nossos resultados só podem ser adequadamente cotejados com os desses autores, embora as marcas testadas sejam diferentes. A equipe de Jansen testou os sistemas Astra[®], Ankylos[®] e Bonifit[®], a de Dibart o sistema Bicon[®] e nós os sistemas Conexão[®] e Titanium Fix[®], ambos produzidos no Brasil.

Um importante aspecto a ser inicialmente considerado é que resolvemos processar nosso estudo *in vitro* porque um de nossos escopos foi analisar se ocorre infiltração bacteriana do interior para o exterior dos implantes. No nosso entendimento, a execução dessa investigação *in vivo* não seria factível, pois ficaria muito difícil sabermos se a bactéria detectada no biofilme perimplantar seria proveniente da interface interna ou se já estaria anteriormente implantada nesse hábitat.

Várias bactérias têm se prestado isoladamente *in vitro* à análise da penetração em diferentes tipos de conexão implante/pilar: *Streptococcus sanguinis* (AMARAL, 2003; CRAVINHOS, 2003; TRAVERSY; BIREK, 1992), *Streptococcus sobrinus* (BARBOSA, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (PIATELLI et al., 2001), *Enterococcus faecalis* (DUARTE et al., 2006), *Porphyromonas gingivalis* (PROFF et al., 2006), *Staphylococcus aureus* (GUINDY et al., 1998) e *Escherichia coli* (CURY et al., 2006; JANSEN; CONRADS; RICHTER, 1997; STEINEBRUNNER et al., 2005). Outros pesquisadores preferiram utilizar misturas de várias bactérias, como as isoladas do biofilme de pessoas com doenças periodontais (QUIRYNEN et al., 1994)

e a de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus oralis* e *Fusobacterium nucleatum* (DIBART et al., 2005).

Um dos critérios usados pela equipe de Dibart para escolher esses três microrganismos foi as diferentes dimensões de suas células. As do cocobacilo Gram-negativo facultativo *A. actinomycetemcomitans* medem aproximadamente 0,4 x 1,0 μ , as do coco Gram-positivo facultativo *S. oralis* 0,5 a 1,5 μ m e as do bacilo Gram-negativo anaeróbio *F. nucleatum* 0,4 a 0,7 x 3,0 a 10,0 μ m (DE LORENZO; MAYER, 2004; DIBART et al., 2005; MAIDEN; LAI; TANNER, 1992; TANNER; LAI; MAIDEN, 1992).

Nossa escolha recaiu sobre duas bactérias que apresentam dimensões e algumas características bastante diferentes entre si e que se desenvolvem rápida e facilmente *in vitro*: *E. coli* e *S. epidermidis*.

E. coli foi escolhido sobretudo pelo seu largo emprego em pesquisas similares e pela sua mobilidade em ambiente líquido, uma característica ausente nas espécies utilizadas por Dibart e colaboradores (2005). É um bacilo facultativo Gram-negativo móvel que mede 1,1 a 1,5 μ m de largura e 2 a 6 μ m de comprimento. Além de ser utilizado para testar *in vitro* a penetração entre as peças de implantes odontológicos, é usado largamente quando se pretende testar os estados de esterilização, desinfecção e contaminação. Pode ser eventualmente encontrado como transitório na boca até de indivíduos saudáveis, mas consegue se implantar principalmente em pessoas com baixa resistência orgânica e/ou com o ecossistema bucal desequilibrado. Assim, *E. coli* já foi isolado, junto com outras bactérias e fungos superinfectantes, de alguns sítios com perimplantite severa, provavelmente como resultado da administração inadequada de antibióticos (ALCOFORADO et al., 1991).

S. epidermidis foi escolhido principalmente porque suas células apresentam reduzidas dimensões (diâmetro médio aproximado de 0,5 μ m) e pela considerável resistência a estresses ambientais, uma característica de várias espécies de seu gênero. São cocos Gram-positivos facultativos que se desenvolvem melhor em aerobiose e apresentam células dispostas isoladamente, ou formando pares ou aglomerados típicos semelhantes a cachos de uva. Apesar da baixa virulência, é detectado em processos de osteomielite nos maxilares. Na boca humana, as proporções de estafilococos aumentam consideravelmente principalmente em portadores de doenças sistêmicas graves, causando superinfecções principalmente

em tecidos periodontais. Alcoforado et al. (1991) e Leonhardt; Renvert e Dahlén (1999) detectaram níveis elevados de estafilococos também em sítios acometidos por perimplantite severa.

Primariamente, nossa intenção era reproduzir a metodologia proposta mais recentemente pela equipe de Dibart, mas esse propósito foi prejudicado porque não conseguimos reproduzir adequadamente o preparo do “ágar mole” usado na contaminação da porção interna dos implantes. Assim, na primeira fase do nosso experimento, passamos a adotar a contaminação via inoculação de mínima porção de caldo de cultivo contendo as duas bactérias, introduzida no fundo do implante com uma micropipeta provida de uma microponteira, substituída a cada inserção, com o cuidado de não tocar as bordas para evitar que o excesso extravasasse, contaminasse as partes externas do implante e fosse responsável por resultados falso-positivos. Após várias tentativas (um dos testes-piloto), pudemos constatar que 0,3µl era a quantidade suficiente para esse propósito. A equipe de Jansen contaminou a parte mais apical do parafuso do pilar, mas com um inóculo maior, de 0,5µl e perdeu várias amostras com este procedimento devido a contaminação externa. No trabalho executado por Dibart e colaboradores, 0,1µl de um ágar mole contendo bactérias foi colocado no topo do pilar, uma distância menor para as bactérias percorrerem até a interface.

Outra importante questão a ser discutida diz respeito à medida do microvalamento existente entre o corpo e o pilar protético dos implantes com conexão cônica. Na pesquisa executada pela equipe de Jansen, os implantes Astra[®] e Bonelit[®] apresentavam microvalamentos com 1 a 2µm, enquanto no sistema Ankylos[®] o valor encontrado foi de 4µm. Dottori (2003) descreveu que os microvalamentos de dois conjuntos pilar/implante do mesmo sistema Ankylos[®] apresentavam 0,0 µm, mas não relatou o número de pontos em que essa medição foi realizada. Já os do sistema Bicon[®] examinados pela equipe de Dibart apresentavam microvalamentos menores que 0,5µm, o que na opinião dos autores impede a penetração bacteriana. Para eles, o selamento da interface se deve a uma espécie de soldagem a frio que se consegue pela presença de um chanfro de 120µm na porção coronária do implante, que cria um sulco menor que 0,5µm quando reunida com o poste do pilar, não permitindo qualquer invasão bacteriana. O conjunto é ainda reunido mediante uma suave batida do pilar contra o implante, isto

é, o pilar não é parafusado ao implante e sim justaposto, adaptado por fricção; assim, é obtida a dita soldagem a frio, como se fosse um amassamento das superfícies. No entanto, as conexões das marcas por nós testadas, embora também cônicas, não se adaptam só por justaposição e sim também por parafusamento. Essa característica pode ter acarretado uma excentricidade no momento do parafusamento, conduzindo a microvalamentos de dimensões bem variáveis em um único conjunto e assim impedindo um assentamento mais preciso do pilar no implante.

Uma outra contribuição de importância do nosso estudo foi a medição do microvalamento dos conjuntos em quatro pontos diametralmente opostos, o que nos permitiu verificar as alterações das dimensões dos microvalamentos em função de excentricidade de assentamento do pilar no implante. Jansen; Conrads; Richter (1997) já haviam feito essa avaliação em quatro locais diferentes, mas a grande maioria dos pesquisadores não fornece essa informação, o que nos leva a acreditar que tenham medido um só local. Em nossa investigação, os microvalamentos implante/pilar dos 20 conjuntos analisados apresentaram dimensões bastante variáveis. A média foi de $3,42\mu\text{m}$ nos conjuntos Conexão[®] e de $3,59\mu\text{m}$ nos Titanium Fix[®], mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Essa determinação, em ambos os casos, parece-nos suficiente para explicar por que permitiram a infiltração bacteriana, que não foi detectada no trabalho da equipe de Dibart, que testou interfaces com medidas inferiores a $0,5\mu\text{m}$. Neste ponto, devemos lembrar que as células de *E. coli* medem $1,1$ a $1,5\mu\text{m}$ x 2 a $6\mu\text{m}$ e as de *S. epidermidis* têm diâmetro de $0,5\mu\text{m}$, portanto com um tamanho bem menor que os microvalamentos dos implantes por nós testados.

Um aspecto digno de nota é que esperávamos que a infiltração se desse de forma semelhante entre os componentes das duas marcas testadas, mas foi observada uma diferença significativa na infiltração de dentro para fora entre os conjuntos de ambas as marcas. Entretanto, ao observarmos a configuração interna dos conjuntos, verificamos que em algumas áreas dos Titanium Fix[®] pareceu-nos que a superfície de um passo de rosca foi comprimida contra a imediatamente superior, possivelmente não deixando espaço entre elas, formando como se fosse uma interrupção do microvalamento nestas áreas. Também observamos áreas com espaços maiores nos conjuntos Titanium Fix[®], com muitas reentrâncias entre uma área

inferior e uma superior, tendo talvez a bactéria de percorrer toda aquela área para chegar numa parte superior para ganhar um caminho para o meio externo. Por outro lado, o diâmetro da ponta da microponteira é de 0,8mm, enquanto que a do fundo do vão dos conjuntos Titanium Fix[®] é de 1,41mm e dos da Conexão[®] é de 1,46mm. Portanto, é possível que quando da manobra de inserção do inóculo no fundo do vão, a lateral da extremidade da microponteira tenha tocado nas paredes internas mais para cima, favorecendo que a bactéria fosse deslocada desde local, ganhando o meio externo num tempo menor. Pelas variações de dimensões observadas nos microvalamentos de ambas as marcas, ainda é possível também, que a falta de controle de qualidade dos sistemas tenha proporcionado conjuntos mais ou menos selados.

Na tentativa de reproduzir as condições presentes *in vivo* fixamos os implantes numa morsa de bancada e o torque para o acoplamento do pilar foi dado com um torquímetro manual, de acordo com a recomendação de cada fabricante: 35Ncm para os da marca Titanium Fix e 20Ncm para os da Conexão. Uma importante inovação introduzida no nosso estudo é que cada implante retirado do seu invólucro foi firmemente posicionado, em posição vertical, numa morsa adaptada para o seu formato, imitando as condições de sua inserção na boca. Esse procedimento permitiu que o torque fosse realizado de forma similar ao realizado com o implante em posição no osso receptor, diferentemente do adotado em alguns estudos onde o implante é seguro por um pinça ou alicate em uma mão e o torquímetro é seguro pela outra mão, portanto não simulando a situação clínica. Por outro lado, o cuidado de seguir a recomendação de cada fabricante foi baseado em vários autores que enalteceram a necessidade de um torque correto para reduzir o micro-espço interno. Goheen et al. (1994) valorizaram a importância do torque para melhorar a adaptação dos componentes protéticos sobre os implantes, pois torques inadequados possibilitam a desadaptação que favorece a infiltração e a colonização bacteriana. De acordo com os resultados obtidos por Gross; Abromovich e Weiss (1999), o grau de infiltração bacteriana depende do torque de fechamento, pois constataram que quanto mais alta era a intensidade do torque, menor infiltração ocorria. Analisando sete sistemas diferentes de implantes, Weiss (2000) alertou para a importância do torque ideal imprimido ao parafuso que retém o conector protético; o torque pode interferir no tamanho do micro-espço entre implante e conector protético quando da necessidade da retirada e colocação dos conectores por

repetidas vezes na confecção da prótese. Essa manobra pode comprometer as roscas do parafuso e das partes internas dos implantes provocando perda progressiva do torque preconizado.

No nosso estudo, foi observada infiltração bacteriana da interface para o meio externo em quatro dos nove implantes Titanium Fix, mas a infiltração do meio externo para a interface foi observada em todos os dez.

Em suma, embora testando implantes de diferentes marcas, os nossos resultados divergem dos obtidos por Dibart et al. (2005) e concordam com os de Jansen; Conrads e Richter (1997), que demonstraram que mesmo os sistemas de implantes com alto grau de precisão de adaptação entre os componentes não podem prevenir completamente a penetração e a colonização bacteriana. Desta forma a necessidade para modificação das interfaces de sistemas de implantes comuns para melhor selar a área de contato implante/pilar passou a ser postulada. Em função desses resultados contrastantes, novas pesquisas se tornam necessárias para esclarecer esse importante quesito.

Baseados nos nossos resultados e em dados existentes na literatura especializada, acreditamos que uma solução para diminuir o acúmulo de bactérias e as complicações decorrentes de um processo inflamatório na crista alveolar é o desenvolvimento de conexões cônicas mais precisas, com microvalamentos de menores dimensões, e desprovidas de parafusamentos, de forma a possibilitar um selamento do tipo soldagem a frio que permita tanto um selamento à penetração de bactérias como uma estabilidade às forças mastigatórias, para resistir aos micromovimentos nas interfaces e, assim, ao efeito de bombeamento do interior para os tecidos circunvizinhos.

7 CONCLUSÃO

A utilização do modelo experimental *in vitro* por nós adotado permitiu-nos concluir que:

- a) a ocorrência de infiltração bacteriana da interface implante/pilar para o meio externo (caldo de cultivo) foi significativamente maior nos conjuntos Conexão[®] que nos Titanium Fix[®]. Por outro lado, a infiltração do meio externo para essa interface foi observada em todos os conjuntos testados, independentemente da marca;
- b) na avaliação realizada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), a medida média dos microvalamentos implante/pilar no sistema Conexão[®], foi de 3,42 μ m e no Titanium Fix[®] foi de 3,59 μ m, uma diferença que não alcançou significância na análise estatística. Em ambos os casos, esses microvalamentos são mais que suficientes para possibilitar a penetração de bactérias;
- c) a análise da configuração interna de uma amostra de cada conjunto pela MEV contribuiu para esclarecer o possível motivo da diferença entre a infiltração nas duas marcas testadas.

REFERÊNCIAS⁹

- ALCOFORADO, G. A. P. et al. Aspects bacteriologiques des echecs des implants dentaires osteointegrés chez l'homme. *J. Parodontol.*, Paris, v. 10, n. 1/91, p. 11-18, 1991.
- AMARAL, J. I. Q. **Análise in vitro da infiltração bacteriana e das desadaptações na interface implante/conector protético em cinco sistemas de implantes endósseos.** 2003. 122 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.
- BARBOSA, R. E. S. **Avaliação da infiltração bacteriana in vitro através da interface implante/conector e comparação entre dois métodos de quantificação da contaminação interna de implantes.** 2006. 141p. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2006.
- BROGGINI, N. et. al. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J. Dent. Res.*, Washington, v. 82, n. 3, p. 232-37, 2003.
- CALLAN, D. P.; COBB, C. M.; WILLIAMS, K. B. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J. Periodontol.*, Indianapolis, v. 76, n. 1, p. 115-120, 2005.
- CALLAN, D. P.; O'MAHONY, A.; COBB, C. M. Loss of crestal bone around dental implants: a retrospective study. *Implant. Dent.*, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 258-266, 1998.
- CRAVINHOS, J. C. **Análise in vitro da contaminação bacteriana na interface implante/conector protético em três sistemas de implantes endósseos.** 2003. 78f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.
- COVANI, U. et al. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant. Dentistry*, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 298-301, 2006.
- CURY, P. R. et al. Avaliação in vitro da microinfiltração bacteriana na interface implante/intermediário. *ImplantNews.*, São Paulo, v. 3, n. 6, p. 613-617, 2006.
- DE LORENZO, J. L. Placa (biofilme) dental. In: _____. **Microbiologia para o estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 6, p. 73-85.
- DE LORENZO, J. L.; CAVENAGUE, M. Microbiologia perimplantar. In: _____. **Microbiologia para o estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 10, p. 151-162.

⁹ De acordo com a NBR 14724 e NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e Seriados em Ciências da Saúde (SECS).

- DE LORENZO, J. L.; MAYER, M. P. A. Componentes bacterianos da microbiota bucal. In: DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de Odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 3, p. 33-42.
- DE LORENZO, J. L.; SIMIONATO, M. R. L.; DE LORENZO, A. Infecção: principal causa de insucessos em implantes dentários. **Rev. ABO Nac.**, São Paulo, v. 5, n. 6, p. 321-24, 1997
- DIBART, S. et al. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 20, n. 5, p. 732-737, 2005.
- DOTTORI, R. H. G. **Avaliação da adaptação e das superfícies envolvidas entre implantes e pilares intermediários estéticos através de microscopia eletrônica de varredura**. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2003.
- DUARTE, A. R. C. et al. In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 77, n. 11, p. 1828-1832, 2006.
- FERRARI, R. B. **Identificação de patógenos periodontais na região interna de implantes bucais de hexágono externo e avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle dessa microbiota**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2004.
- GOHEEN, K. L. et al. Torque generated by handheld screwdrivers and mechanical torquing devices for osseointegrated implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 9, n. 2, p. 149-155, 1994.
- GROSS, M.; ABRAMOVICH, I.; WEISS, E. I. Microleakege at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: a comparative study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 14, n. 1, p. 94-100, 1999.
- GUINDY, J. S. et al. Bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained implant-borne crowns in vitro. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 403-408, 1998.
- HEIJDENRIJK, K. et al. Feasibility and influence of the microgap of two implants placed in a non-submerged procedure: a five-year follow-up clinical trial. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 77, n. 6, p. 1051-1060, 2006.
- JANSEN, V. K.; CONRADS, G.; RICHTER, E. J. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. **Int. J. Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 12, n. 4, p. 527-540, 1997.
- KELLER, W.; BRAGGER, U.; MOMBELLI, A. Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 209-217, 1998.

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

LISGARTEN, M. A. Microorganisms and dental implants. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 70, n. 2, p. 220-222, 1999.

MAIDEN, M. F. J.; LAI, C-H; TANNER A. Characteristics of oral gram-positive bacteria. In: SLOTS, J; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby, 1992. cap. 20, p. 342-372.

McARTHUR, G. R.; GUCKES, A. D. Preventing bacterial colonization associated with two types of implant abutments. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 70, n. 5, p. 479,1993.

OLIANI, D. **Avaliação da eficácia da solução de clorexidina a 2% no controle do desenvolvimento de periodontopatógenos na interface coroa/pilar protético em próteses dentais parafusadas sobre implantes**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2004.

O'MAHONY, A.; MACNEILL, S. R.; COBB, C. M. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 249-256, 2000.

ORSINI, G. et al. Tissue reactions, fluids, and bacterial infiltration in implants retrieved at autopsy: a case report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 5, n. 2, p. 283-286, 2000.

PERSSON, L. G. et al. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 90-95, 1996.

PIATTELLI, A. et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, n. 9, p.1146-1150, 2001.

PROFF, P. et al. Bacterial colonization of interior implant threads with and without sealing. **Folia Morphol.**, Warsaw, v. 65, n. 1, p. 75-77, 2006.

QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants: an in vivo study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 4, n. 3, p. 158-161, 1993.

QUIRYNEN, M. et al. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 239-244, 1994.

RIMONDINI, L. et al. Internal contamination of 2-component implant system after occlusal loading and provisionally luted reconstruction with or without a washer device. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, n. 12, p. 1652-1657, 2001.

SARTORI, S. **Avaliação *in vivo* da capacidade da membrana de silicone vedar a infiltração de bactérias periodontopatogênicas no micro-espaco entre o pilar protético e implantes de hexágono externo.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2006.

SENNERBY, L.; LEKHOLM, U. The soft tissue response to titanium abutments retrieved from humans and reimplanted in rats. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 4, n.1, p. 23-27, 1993

STEINEBRUNNER, L. et al. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 20, n. 6, p. 875-881, 2005.

STEFLIK, D. E. et al. Dental implants retrieved from humans: a diagnostic light microscopic review of the findings in seven cases of failure. **Int J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard IL, v. 6, n. 2, p. 147-153, 1991.

TANNER, A ; LAI, C-H; MAIDEN, M. F. J. Characteristics of oral gram-negative bacteria. In: SLOTS, J; TAUBMAN, M. A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. St. Louis: Mosby, 1992. cap. 19, p. 299-341.

TRAVERSY, M. C.; BIREK, P. Fluid and microbial leakage of implant-abutment assembly in vitro [abstract 1909]. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 71 (special issue), p. 754, 1992.

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