

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Wang Hsing Han

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO BLUE[®]M NA
INTERFACE PILAR-IMPLANTE.**

SÃO PAULO

2019

WANG HSING HAN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO BLUE[®]M NA
INTERFACE DO PILAR E IMPLANTE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Yeon Jung Kim

SÃO PAULO

2019

WANG HSING HAN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO BLUE[®]M NA
INTERFACE DO PILAR E IMPLANTE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da
Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Odontologia. Orientadora: Profa. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo, 11 de março de 2019

Banca Examinadora

Profa. Dra. Yeon Jung Kim

Profa. Dra. Débora Pallos

Profa. Dra. Karina Cogo Müller

Conceito Final: _____

Dedico este trabalho,

A Deus, pois não sou nada sem a fé que tenho nEle

À minha companheira de todos os tempos, Inzu, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem ela nenhuma conquista valeria a pena

À minha família, em especial ao meu pai (in memoriam) e minha mãe, que dignamente me apresentaram à importância da educação e da família, e ao caminho da honestidade e da persistência.

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dr^a. Yeon Jung Kim, minha orientadora, o meu total reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus alunos, e pelo seu dom no ensino da ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

A prof^a. Débora Pallos, co-orientadora deste trabalho, por exigir de mim muito mais do que eu imaginava ser capaz de fazer. Minha gratidão por compartilhar sua sabedoria, o seu tempo e sua experiência.

Ao colega e amigo Sabino Haroldo Ferreira, que exemplifica a ética e competência profissionais, a dedicação e o aprimoramento contínuo, pelo incentivo e oportunidade de convívio.

A realização deste projeto de pesquisa só foi possível com o apoio de vários colaboradores, que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, o meu reconhecimento e gratidão:

- Profa. Dra. Karina Cogo Müller, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - Unicamp;

- Rafaela Parolina de Carvalho, mestranda em Odontologia em Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - Unicamp;

- Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalém, responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de farmacologia e Anestesiologia Terapêutica Da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - Unicamp.

RESUMO

A peri-implantite tem sido descrita como uma alteração patológica dos tecidos ao redor dos implantes osseointegrados, sendo o acúmulo do biofilme considerado como um de seus principais fatores etiológicos. Conseqüentemente a infiltração marginal bacteriana entre a conexão pilar-implante pode acarretar a peri-implantite. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do Blue[®]M gel oral na prevenção da contaminação microbiana por *Porphyromonas gingivalis* da interface pilar-implante, em três diferentes tipos de conexões, HE, HI e CM. Foram utilizados o total de 45 conjuntos de implantes dentários de três tipos de conexões diferentes e pilares que foram divididos em três grupos, sendo que cada grupo possui cinco conjuntos de cada conexão (n=5/conexão/grupo): grupo Blue[®]M (BM) (n=15) grupo Clorexidina 2% (CX) (n=15) e grupo de controle positivo bacteriano (n=15). Os conjuntos de implantes e pilares foram incubados em tubos de ensaios contendo cultura de *Porphyromonas gingivalis* em condições de anaerobiose, após 4 dias de incubação as amostras da interface pilar-implante foram coletadas e processadas para quantificação absoluta pela qPCR. Verificou-se que dos três tipos de conexões pesquisadas neste trabalho, o vedamento da conexão HE apresentou o pior resultado em todos os grupos, seguido de HI e CM, respectivamente. Concluiu-se que há contaminação bacteriana em todos tipos de conexões na interface pilar-implante. A aplicação do Blue[®]M diminuiu a infiltração bacteriana através do *microgap* da conexão pilar-implante.

Palavras-chave: implante dentário, clorexidina, bluem, conexão pilar-implante, biofilme, peri-implantite.

ABSTRACT

Peri-implantitis has been described as a pathological alteration of the tissues around osseointegrated implants, with biofilm accumulation considered as one of its main etiological factors. The marginal bacterial infiltration between the abutment-implant connection can lead to peri-implantitis. The use of products such as chlorhexidine and Blue[®]M may be one of the solutions as a way to avoid the contamination of this interface, EH, IH and CM. We used 45 abutment-implant sets of three different types of connections divided into three groups of 15 implants each: external hexagon, internal hexagon and morse cone. For each group was also divided into three sub-groups of 5 implants each. Two subgroups were introduced chlorhexidine and Blue[®]M, the third being the control group. Pilot studies were done to establish the methodology. The implants and abutments were incubated for 4 days in test tubes containing *Porphyromonas gingivalis* culture medium, and disconnected to collect the implant-to-implant interface samples for DNA quantification. It was concluded that there is bacterial contamination in all types of connections at the abutment-implant interface. The application of Blue[®]M decreased bacterial infiltration through the microgap of the abutment-implant connection.

Key words: dental implant, chlorhexidine, bluem, connection pillar-implant, biofilm, peri-implantiti.

Lista de Siglas e Abreviaturas

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BM	Blue [®] M
CX	Clorexidina
CM	Cone-Morse
CO ₂	Dióxido de carbono (gás carbônico)
°C	Graus Celsius
HI	Hexágono interno
HE	Hexágono Externo
H ₂	Hidrogênio
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	nanômetro
N	Newton
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>PA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth

Lista de Figuras

Figura 1 – Desenho esquemático de um implante	13
Figura 2 – Tipos de conexões de implante	14
Figura 3A – Sondagem e placa bacteriano	15
Figura 3B – Peri-implantite com perda óssea	15
Figura 4A – Vista seccional do conjunto pilar-implante	16
Figura 4B – Área do <i>microgap</i> aumentada em 300x	16
Figura 5 – Reservatório bacteriano gerada pela infiltração	16
Figura 6 – Corte sagital de implante HE	18
Figura 7 – Corte sagital de implante HI	19
Figura 8 – Corte sagital de implante CM	20
Figura 9 – Estrutura química das moléculas de oxigênio e clorexidina	22
Figura 10 – Linha de produtos Blue [®] M.....	22
Figura 11 – Cultura de <i>Pg</i> na placa	39
Figura 12 – Tubos de amostras no agitador	40
Figura 13 – Câmara de anaerobiose	40
Figura 14 – Microscópio Óptico	40
Figura 15 – Coloração de Gram	41
Figura 16 – Blue [®] M em gel oral	42
Figura 17 – Clorexidina 2% em gel	43
Figura 18 – Inserção do Blue [®] M e Clorexidina	43
Figura 19 – Torqueando pilar no implante	43
Figura 20 – Remoção do excesso do produto	44
Figura 21 – Tubos de ensaio contaminado contendo implante-pilar.....	44
Figura 22 – Remoção do material no interior do implante	45
Figura 23 – Imergindo o microbrush no eppendorf	45
Figura 24 – Bloco de calor	47
Figura 25 – Comparação da quantificação de <i>Pg</i> entre as diferentes conexões ...	50
Figura 26 – Comparação da quantificação de <i>Pg</i> entre as mesmas conexões	51

Lista de Fluxograma e Tabela

Fluxograma 1 – Divisão de implantes por tipo de conexão e produto	42
Tabela 1 – Primers e sonda de PCR em tempo real.....	48
Tabela 2 – Quantificação de Pg nas diferentes conexões	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Tipo de conexões	17
1.1.1	Conexão tipo Hexágono Externo	18
1.1.2	Conexão tipo Hexágono Externo	18
1.1.3	Conexão tipo Cone-Morse	19
1.2	Tratamento anti-microbiano	20
2	OBJETIVO	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Microrganismo e condições de cultura	38
4.2	Estudo Piloto 1	38
4.3	Estudo Piloto 2	39
4.4	Experimento	41
4.4.1	Atividade antimicrobiana na contaminação por <i>Pg</i> da IPI	41
4.4.2	Extração de DNA	45
4.4.3	Detecção e quantificação da contaminação por <i>Pg</i> da IPI por qPCR ...	47
4.5	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	55
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	56

1 INTRODUÇÃO

O advento dos implantes trouxe à Odontologia um novo elemento auxiliar para a reabilitação oral de pacientes com ausências dentárias, com o passar dos tempos, a implantodontia tem evoluído tecnicamente e tecnologicamente, mostrando excelentes resultados. Assim, torna-se possível afirmar que, em condições ideais, o índice de sucesso é superior a noventa por cento no que tange aos requisitos de retenção, estabilidade, função e conforto, quando as próteses estão associadas aos implantes (Malo et al, 2008) (Figura 1)

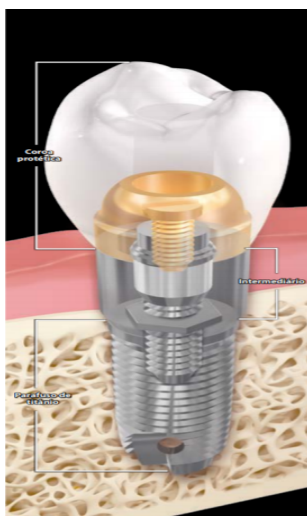


Figura 1 - Desenho esquemático do implante original de Branemark, de rosca passiva e implante liso, sem tratamento de superfície.
Fonte: Figura retirada de Sartori et al, 2016

O grande avanço dos implantes osseointegráveis é alcançado seguindo diversos princípios cirúrgicos e técnicos até a instalação das próteses. Características como a meticulosidade por parte do cirurgião, os aspectos micro-estruturais das espiras e o tratamento de superfície do titânio, são fatores essenciais para a obtenção da osseointegração (Buchs et al., 1995).

Os avanços tecnológicos relacionados aos implantes são inúmeros, haja vista as modificações no desenho, no tratamento de superfície, interfaces protéticas e outras inovações (Marchack et al., 2005). O mercado odontológico oferece diferentes sistemas e conexões entre restaurações protéticas e implantes. (Ribeiro et al, 2008). A partir do início da comercialização do Sistema Bränemark em 1983, que eram do tipo de conexão Hexágono Externo (HE), surgiram nos anos subsequentes vários sistemas e conexões de implantes osseointegrados.

Outros fabricantes desenvolveram as suas próprias conexões como Cone Morse (CM) e Hexágono Interno (HI) para a prótese sobre implante. (Rodrigues et al, 2007) (Figura 2)

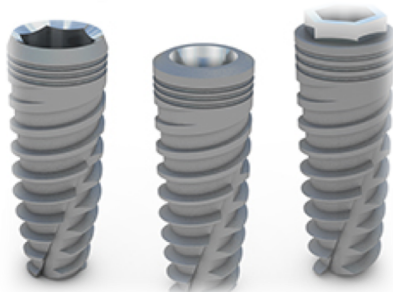


Figura 2 – Conexões do tipo CM, HI e HE do implante do Sistema Dentoflex
(Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil)

Fonte: <http://dentoflex.com.br/familias-de-implantes/>

O sucesso dos implantes ósseos integrados depende de vários fatores: qualidade e quantidade do tecido ósseo em que estão ancorados, tipo e qualidade dos materiais utilizados em sua confecção, técnicas cirúrgicas e protéticas adequadas e fundamentalmente do planejamento protético, que possibilita distribuição equilibrada das forças funcionais as quais o sistema estará sujeito (Prado et al., 2013).

No entanto, apesar da literatura científica comprovar as elevadas taxas de sucesso na reabilitação oral com implantes, as complicações associadas a uma reabilitação oral com implantes podem ainda ser agrupadas em duas categorias distintas: complicações mecânicas e complicações biológicas (Tagliari et al., 2015)

Um dos fatores que levam aos insucessos e falhas das técnicas e conseqüentemente a perda do implante é a peri-implantite. A peri-implantite é um termo proposto por Mombelli et al, em 1997, e descreveu como uma alteração patológica dos tecidos ao redor dos implantes osseointegrados. No implante, assim como ocorre no dente, o biofilme causa uma resposta do hospedeiro, resultando no desenvolvimento de inflamação na mucosa peri-implantar, chamada de mucosite, que é um processo reversível após a remoção do biofilme. Entretanto, se não tratada, a inflamação pode avançar apicalmente, e se estender ao tecido ósseo resultando em perdas ósseas verticais e horizontais, caracterizando a peri-implantite (Figura 3A). O termo peri-implantite foi introduzido ao final da década de 1980, para definir a reação inflamatória com perda de suporte ósseo em tecidos circunvizinhos a um implante

funcional, com perda progressiva da osseointegração e do osso marginal de suporte, podendo ser comparada a uma periodontite e estando frequentemente associada com supuração e bolsas mais profundas, além de mobilidade, dor ou sensação de corpo estranho, e que eventualmente, pode levar à perda do implante (Bottino et al, 2005; Greestein et al., 2010; Berglundh et al., 2012) Dentro desse contexto, algumas definições surgiram no *1st European Workshop on Periodontology (EWOP)* (Albrektsson, Isidor, 1994): enquanto mucosite peri-implantar foi definida como uma reação inflamatória reversível nos tecidos moles ao redor do implante em função, peri-implantite descreve uma reação inflamatória associada com perda de suporte ósseo ao redor do implante em função (Figura 3B)

A microbiota presente ao redor dos implantes, apresenta uma semelhança grande entre a microflora peri-implantar e a periodontal. Os sítios peri-implantares doentes exibiam uma microflora composta em sua maioria por *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* e *Fusobacterium nucleatum*. (Figueredo et al., 2001). Assim, tanto a peri-implantite como a periodontite podem ter a mesma causa, que é o biofilme dental ou a placa bacteriana. Por isso, a instalação de um processo infeccioso em torno do implante é considerada como a principal causa de insucesso nesse procedimento, sem esquecer a importância etiológica das sobrecargas mecânicas (Oliveira et al., 2015)

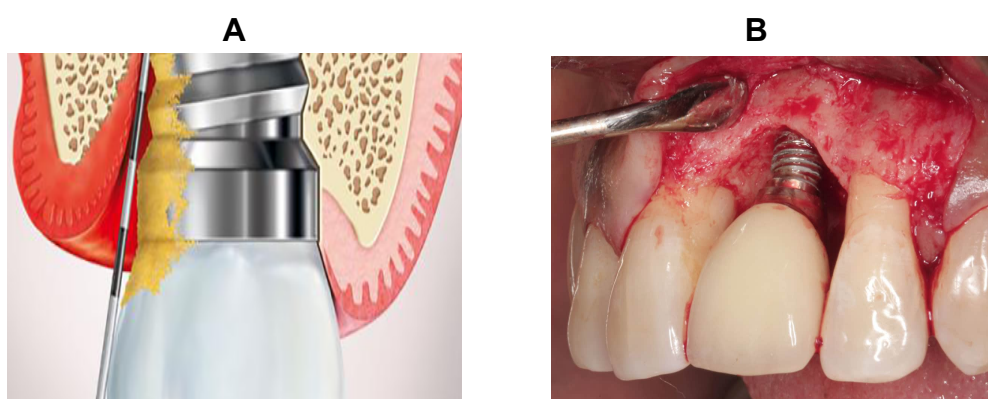


Figura 3 – Peri-implantite. A - Desenho esquemático da sondagem e a presença da placa bacteriana; B - perda vertical de osso alveolar expondo as espiras do implante

Fonte: <https://www.bluemcare.com/pt-br/problemas-bucais/peri-implantite/>

Os fatores mecânicos que causam a peri-implantite, de acordo com a perda de torque dos parafusos dos implantes, descimentação da coroa, fratura dos pilares,

trauma oclusal e fratura do próprio implante (Alcoforado et al. 2008),. Nos sistemas de implantes chamados de dois estágios, o pilar protético é retido no implante através de um método mecânico de fixação (Figura 4A), o que resulta em uma microfenda ou *microgap* entre o pilar e o implante (Figura 4B). Essa fenda ou *gap* acaba gerando um reservatório bacteriano que pode levar a infecções dos tecidos moles. Isso interfere, a longo prazo, na saúde dos tecidos peri-implantares (Orsini et al, 2000), intensificando a perda de suporte periodontal (Figura 5). A colonização bacteriana inicia-se 30 minutos após a instalação do implante, o que aumenta a preocupação em controlar ou mesmo minimizar o crescimento bacteriano (Furst et al. 2007).

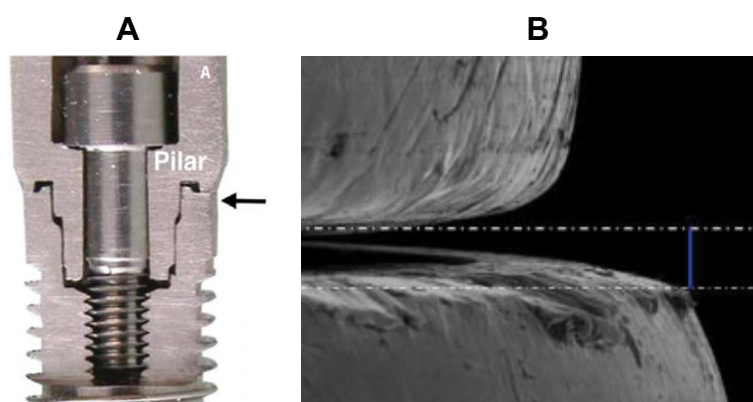


Figura 4 – Área do *microgap*. A - Pilar está unido no implante por meio de um parafuso protético. B - imagem do *microgap* aumentada em 300x no MEV.

Fonte: Figura retirada de Faria KO et al, 2013

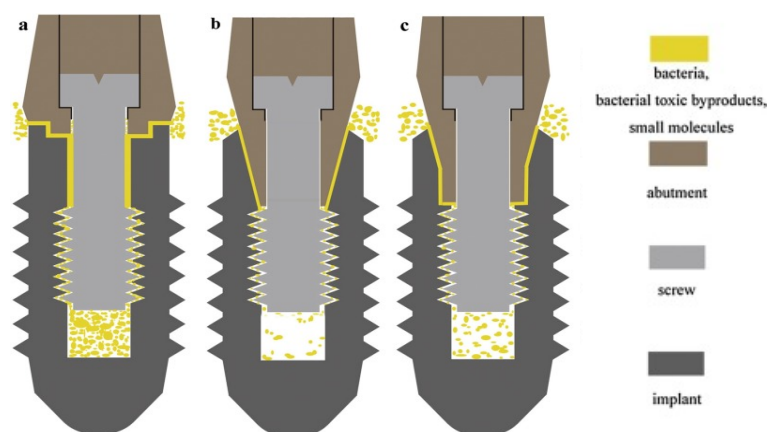


Figura 5 – Reservatório de bactérias gerada pela infiltração bacteriana através de *microgap*, em três tipos de conexão. a=HE / b=CM / c=HI

Fonte: Figura retirada de Liu Y et al, 2017

Outro fator mecânico, é a sobrecarga oclusal após a instalação de prótese que pode resultar em um aumento do estresse no implante e na conexão pilar-implante, segundo Santos et al., em 2013. O ajuste incorreto de conexão pilar-implante pode causar fratura e perda de parafuso protético, dano na prótese e no implante. O *microgap* existente entre a conexão pilar-implante permite a infiltração e a permeabilidade de fluidos salivares contendo células inflamatórias e bactérias, causando a formação de biofilme e placa bacteriana (Covani et al., 2006).

Jansen et al. (1997), afirmavam que uma interface pilar-implante com fenda ampla pode ter uma influência negativa na saúde dos tecidos peri-implantares. A presença de bactérias no interior de implantes de titânio é um achado relatado por diversos autores, mesmos nos sistemas considerados de ponta, onde a passagem bidirecional de fluidos é evidente (Traversy et al., 1992)

Para tentar reduzir a colonização bacteriana e melhorar a osseointegração, novos sistemas de implantes com variados tipos de conexões e tratamentos de superfícies são rotineiramente lançados no mercado, oferecendo inovações em suas propriedades, nas características de superfície e na adaptação dos componentes protéticos, com o objetivo de minimizar, restringir ou erradicar as deficiências das conexões tradicionais (Finger et al., 2003; Verdugo et al., 2014).

1.1 Tipo de Conexões

Os pilares protéticos desenvolvidos até os tempos de hoje são de alguma forma parafusados em implantes que fornecem dois tipos de conexões: interna e externa. Independentemente do tipo de conexões, é gerada uma interface entre o implante e o componente protético, a qual está localizada por baixo da margem gengival e no nível do osso remanescente. As conexões do tipo CM são constituídas de corpo em formato cônico com roscas que auxiliam sua instalação e ancoragem no leito ósseo em todo o seu comprimento. A preferência pelo CM se dá pela capacidade de vedação do mesmo e, principalmente, de formação óssea ao redor. (Araújo et al, 2011).

1.1.1 - Conexão tipo Hexágono Externo

Os implantes de conexão hexágono externo são os mais comumente utilizados desde o início da osseointegração (Figura 6). Esse desenho do sistema Brånemark tem sido utilizado clinicamente desde 1965, porém apresenta algumas desvantagens, como pouca área de contato entre o conector do pilar protético e a porção hexagonal da cabeça do implante (0,7 mm), e também permite alguns graus de rotação entre o hexágono externo do implante e o hexágono interno do pilar protético, gerando um grande esforço no parafuso de fixação e transferindo grande tensão ao mesmo, que com o tempo tende a afrouxar, aumentando mais o *microgap* e a infiltração bacteriana, podendo chegar a fraturar o parafuso protético com relativa facilidade (Binon et al., 1998; Hunt et al., 2005).

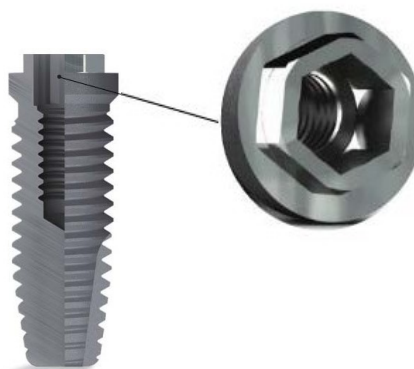


Figura 6 – Corte sagital de Implante HE do sistema SIN com a cabeça do implante aumentada mostrando o hexágono (SIN Implante, São Paulo, SP, Brazil)

Fonte: Figura retirada do catálogo SIN 2011

1.1.2 - Conexão tipo Hexágono Interno

Stevão et al. (2005) declararam que, com a intenção de distribuir as forças geradas pela mastigação para o interior do implante a fim de proteger o parafuso de fixação de forças oclusais excessivas e reduzir a micro infiltração, foi desenvolvido o hexágono interno, que tem algumas vantagens sobre o HE, como: favorecer menor desaperto e perda de parafusos; absorver as sobrecargas externas; seu desenho possibilita uma distribuição mais homogênea das tensões ao redor dos implantes em relação aos parafusos com HE, diminuindo o *microgap* e com isso diminui também a infiltração bacteriana e as tensões sobre a crista óssea (Bernardes et al., 2006)

No HI, o hexágono e o parafuso passam para dentro do corpo do implante e o comprimento do hexágono aumenta para 1,2 mm (Figura 7). Isso torna mais estável a conexão pilar-implante, reduzindo a probabilidade de afrouxamento do parafuso de fixação. A força gerada por micro movimentação é dissipada para as paredes adjacentes ao hexágono do implante (Verdugo et al., 2014). Diamantino et al. (2008) afirmaram que o comportamento dos HI superou o HE tanto na distribuição de carga axial (1,28% a menos para HI), quanto na distribuição não axial (12,93% a menos para HI). Os autores concluíram que para carga não axial existiu uma diferença estatisticamente significativa na distribuição da tensão ao corpo do implante.

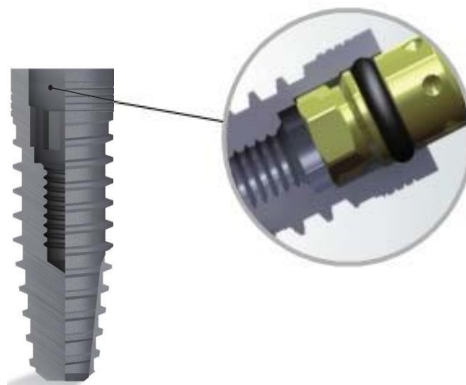


Figura 7 – corte sagital de Implante HI do sistema SIN com a área conexão interface-pilar aumentada (SIN Implante, São Paulo, SP, Brazil)

Fonte: Figura retirada do catálogo SIN 2011

1.1.3 - Conexão tipo Cone Morse

Esse tipo de conexão traz uma melhora na vedação do tráfego bacteriano entre interface pilar-implante permitindo melhor saúde periodontal, e proteção do nível estético, combatendo a recessão óssea marginal.

Dilbart et al (2005) realizaram um estudo apontando que o selamento promovido pelo sistema CM é suficientemente hermético para impedir invasões bacterianas na interface pilar-implante (Figura 8). O gap existente ao redor do implante também é diminuído, reduzindo assim o processo inflamatório e a perda óssea marginal. Nessa geometria apresenta um desenho interno preciso que, durante a

instalação do intermediário protético ao implante, permite um íntimo contato das superfícies sobrepostas, adquirindo uma resistência mecânica semelhante a de uma peça única. Nenhum *microgap* existe nesta interface, o que confere uma maior resistência aos movimentos rotacionais. Neste tipo de conexão há uma redução de pontos de tensão, uma maior capacidade de suportar forças horizontais e uma alta resistência mecânica. Esses fatores permitem a confecção de próteses com características mais próximas dos naturais, sem a necessidade de modificações oclusais (Diamantino et al., 2008)

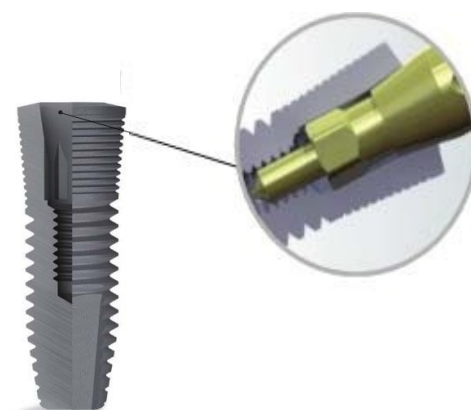


Figura 8 – corte sagital de Implante CM do sistema SIN com a área conexão interface-pilar aumentada (SIN Implante, São Paulo, SP, Brazil)

Fonte: Figura retirada do catálogo SIN 2011

1.2 Tratamento anti-microbiano

A implantodontia está sempre em busca de novos meios e produtos para evitar e combater a peri-implantite. As indústrias odontológicas e institutos de pesquisa têm objetivado em aprimorar tanto em desenhos de conectores e implantes, como também em desenvolver produtos e/ou adicionar substâncias com potencialidade de ação química ou física, para auxiliar no controle da microinfiltração microbiana através do *microgap* (Fernandes et al, 2012). Para impedir que as bactérias invadam a conexão pilar-implante, idealmente, os agentes químicos deveriam apresentar as seguintes características: ter espectro de ação antimicrobiana ampla, ação rápida sobre os patógenos, ser atóxico, inodoro, de fácil utilização e não provocar alterações superficiais que causem danos ao objeto desinfetado (Cottone et al., 1987; Molinari et al., 1988; Molinari et al., 1991; Fernandes et al., 2013).

A utilização de produtos antimicrobianos como iodofórmio, clorexidina ou

hidróxido de cálcio tem sido estudados como forma de diminuir a infecção, nas fases cirúrgica e/ou protética, evitando assim danos teciduais e possíveis perda óssea após a osseointegração. A presença de infecção peri-implantar imediatamente após o período de osseointegração pode surgir a partir do procedimento de reabertura do implante, no qual o implante dentário é exposto a cavidade bucal.

O gluconato de clorexidina tem sido vastamente estudado e utilizado, sendo considerado como padrão ouro na profilaxia e no combate de infecções bacterianas (Kluk et al., 2016). A eficácia química da clorexidina como agente antimicrobiano na prevenção de acúmulo de placa foi largamente estudada e comprovada ao longo dos anos (Bressan et al., 2013). Porém existem algumas desvantagens no uso da clorexidina, como inclusão tradicional de creme dental e enxaguatório bucal à base de clorexidina em tratamento complexo pode causar efeitos adversos tais como a alteração da flora bucal, manchamento da língua e dos dentes e distúrbios do paladar (Makeeva et al., 2014)

Recentemente foi lançado no mercado outro antisséptico, com o princípio ativo a base de oxigênio, o Blue[®]M (Bluem Europe BV, Zwolle, Overijssel, Holland), que despertou interesse do autor por seu alto poder bactericida e cicatrizante nos processos infecciosos e cirúrgicos. Blue[®]M é um agente antisséptico que contém alta concentração de oxigênio, em parte derivado das enzimas do mel e também a lactoferrina, um poderoso anti-oxidante (Makeeva et al., 2014).

De acordo com o site oficial do fabricante (<https://www.bluemcare.com/pt-br/productos/>), o produto é indicado na prevenção e tratamento da contaminação microbiana do interior dos implantes dentais, em fios de sutura, nos componentes cirúrgicos e protéticos, e nas próteses implanto-suportadas provisórias e definitivas. Também tem ação para melhorar a cicatrização de ferimentos ao se elevar os níveis de oxigênio nas bolsas gengivais e feridas resultantes de extrações, implantes, quimioterapias e próteses.

O oxigênio, de acordo com o fabricante do Blue[®]M, aumenta o metabolismo celular e a produção de energia, a síntese de colágeno e a força de tensão, a atividade bacteriana, a angiogênese e promove a revascularização, como também promove e facilita a liberação pelo organismo de fatores de crescimento. Comparado com a molécula de clorexidina (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀), a molécula de oxigênio na forma não reativa

(O₂) possui uma dimensão muito menor e que tem um poder muito maior na penetração no biofilme (Figura 9).

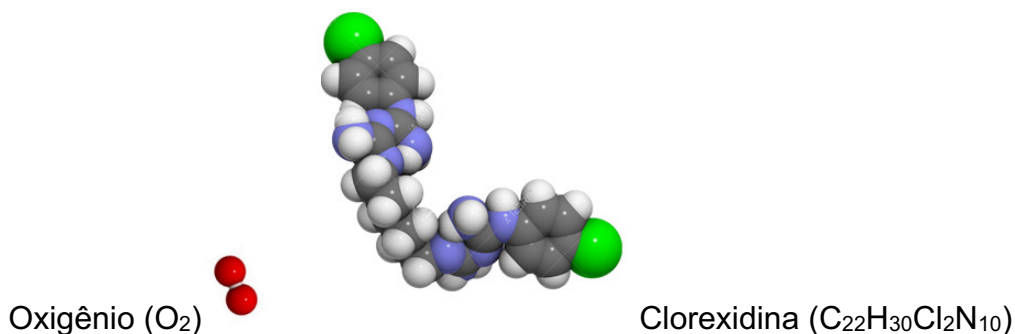


Figura 9 – Estrutura química das moléculas de oxigênio moléculas de clorexidina.

Fonte: https://www.123rf.com/photo_15066094_chemical-structure-of-a-molecule-of-chlorhexidine-an-often-used-antiseptic-compound-it-is-used-in-mo.html

No mercado, o Blue[®]M é apresentado em forma de creme dental, enxaguante bucal, espuma bucal e gel oral (Figura 10). Por apresentar em formato de gel, ele pode, em tese, preencher o espaço da conexão pilar-implante e talvez com isso evitar a colonização bacteriana e suas consequências, eliminar a infiltração bacteriana e o mau odor característico das conexões provenientes das bactérias.



Figura 10 – produtos Blue[®]M (Europe BV, Zwolle, Overijssel, Holanda) nas apresentações de creme dental, enxaguante bucal, espuma bucal e gel oral.

Fonte: <https://www.bluemcare.com/pt-br/>

2 OBJETIVO

Neste estudo, tem-se como objetivo avaliar a eficácia do Blue[®]M gel oral na prevenção da contaminação microbiana por *Porphyromonas gingivalis* da interface pilar-implante, em três diferentes tipos de conexões.

A hipótese nula desta pesquisa é que o agente antimicrobiano em questão não possui atividade antimicrobiana na interface pilar-implante, independentemente do tipo de conexão utilizada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Devido aos conceitos de colonização bacteriana na interface pilar-implante e conseqüentemente a redução da base óssea, o desenho dos implantes e a conexão entre seus componentes foram modificados na tentativa de minimizar essa problemática. Normalmente, as conexões protéticas são divididas em Hexágono Externo (HE), Interno (HI) e Conexões Cônicas.

As conexões cônicas, também conhecidas como conexões Cone Morse (CM), foram adaptadas à Odontologia de um sistema desenvolvido por Stephen A. Morse em 1864 para guiar fresas helicoidais. Porém esse sistema tem uma conicidade padronizada que a grande maioria das empresas fabricantes de implantes não seguem. Sendo assim, o termo correto para se referirem a seus produtos é como conexões cônicas. Estas são consideradas superiores devido ao contato íntimo dos metais pilar-implante, criando um selamento e tornando assim a interface muito estreita para a passagem de bactérias (Dibart et al., 2005).

Em 1993, Quirynen e van Steenberghe avaliaram em estudo *in vivo* a colonização bacteriana na parte interna de implantes do sistema Branemark., foram selecionados nas seguintes condições: implantes instalados há mais de 2 anos, ausência de reabsorção óssea, profundidade de sulco de 3,5 mm ao redor do implante, boas condições gengivais e que não tivessem feito uso de antibióticos nos 6 meses anteriores ao estudo. A porção apical do parafuso do pilar, instalada há 3 meses, foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Todos os pilares apresentaram uma quantidade significativa de microrganismos, principalmente de cocos (86,2%) e bacilos sem motilidade (12,3%). Organismos com motilidade (1,3%) ou espiroquetas (0,1%) foram registrados apenas esporadicamente. Os autores ressaltam que a infiltração bacteriana na interface pilar-implante é a origem mais provável para essa contaminação.

Quirynen et al. em 1994, realizaram estudo *in vitro* para examinar a existência de infiltração microbiana nos componentes de implantes do sistema Branemark. Para isso, 32 conjuntos pilar-implante foram instalados em meio de cultura previamente contaminados com microrganismos orais. Para avaliar a infiltração na interface implante-pilar, 16 conjuntos foram parcialmente submersos em meio de

cultura. As 16 amostras restantes foram totalmente imersas para avaliar a infiltração nas duas interfaces (pilar-implante e pilar-prótese). Após 7 dias de incubação anaeróbia, os microrganismos da parte interna dos implantes foram coletados e incubados em meios de cultura em condições anaeróbias. Microrganismos foram encontrados nas amostras que foram totalmente submersas em meio e em menor número nos implantes parcialmente imersos, indicando que a contaminação bacteriana ocorreu nas duas condições testadas. Os autores ressaltam a relação que essa infiltração bacteriana pode ter com peri-implantite, cuja a causa ainda não foi estabelecida.

Wu-Yuan et al. em 1995 realizaram estudo microscópico para avaliar a aderência bacteriana à superfície do titânio. Para isso, a adesão das bactérias orais: *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus*, e *Porphyromonas gingivalis* à superfície de discos de titânio com diferentes texturas (lisas, sulcadas e rugosas) foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura. A maior adesão bacteriana foi observada nas superfícies de titânio com revestimento rugoso. As superfícies lisas promoveram menor aderência para as bactérias *Streptococcus sanguinis* e *Actinomyces viscosus*. Entretanto, baseado na contagem direta de células e na avaliação com microscópio eletrônico de varredura, a *Porphyromonas gingivalis* aderiu igualmente bem tanto nas superfícies com revestimentos lisos quanto nas de revestimento sulcado. Para os autores, características da superfície de titânio dos implantes pareceram ter influência na aderência bacteriana *in vitro*.

Jansen et al. em 1997, avaliaram a infiltração microbiana e o *gap* marginal na interface entre o pilar e o implante. Foram utilizadas 13 diferentes combinações de pilar-implante de 9 sistemas de implantes: Ankylos® (Dentsply Friadent, Mannheim, Germany), Astra® (Astra Implant systems, Astra Tech, Mölndal, Sweden), Bonelit® (Straumann, Waldenburg, Switzerland), Brånemark® (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Sweden), Calcitek® (Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA), Frialit® (Dentsply Friadent, Mannheim, Germany), sistema Ha-Ti, IMZ® (IMZ Interpore International, Irvine, CA, USA) e Semados® (Bego Goldschlägerei, Bremen, Germany). A porção apical do parafuso do pilar de cada amostra foi contaminada com 0,5 µl de suspensão de *Escherichia coli* e os mesmos foram então cuidadosamente conectados aos implantes. Os conjuntos foram então colocados em tubos de ensaios

contendo solução nutriente. O implante Calcitek® e o sistema Ha-Ti apresentaram infiltração bacteriana em todas as condições. A aplicação do banho de silicone no componente protético Frialit® reduziu a microinfiltração quando comparado ao mesmo componente sem o tratamento. Na maioria dos casos, a infiltração foi observada nos dois primeiros dias. A interface entre implante-pilar foi medida utilizando microscópio eletrônico de varredura em cada combinação. Todas as interfaces apresentaram um *gap* com menos de 10 µm com exceção do pilar modificado de encaixe octogonal da Bonefit® que apresentou valores máximos de 12µm.

Gross et al. em 1999 realizaram um estudo comparativo sobre a microinfiltração na interface pilar-implante de implantes osseointegrados. O grau de infiltração na interface de 5 sistemas de implantes foi comparado variando os torques de fechamento: Spline® (Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA), ITI® (Institut Straumann AG, Waldenburg, Switzerland), CeraOne® (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Sweden), Steri-Oss® (Nobel Biocare, Yorba Linda, CA, USA) e 3i® (Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA). Os resultados apresentaram infiltração em todos os sistemas testados, com diferença entre sistemas, amostras e torque de aperto. Quando os valores de torque foram aumentados para o recomendado pelo fabricante, a microinfiltração diminuiu significativamente. A análise de variância demonstrou interação entre o torque e o tempo de microinfiltração e entre sistemas e o tempo da microinfiltração. Os resultados indicaram ainda que fluídos e odores moleculares foram capazes de passar através da interface pilar-implante de todos os sistemas estudados. Os autores concluíram através desse estudo que fluídos contendo bioprodutos bacterianos e nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, podem passar através do *gap* existente na interface, contribuindo em parte para o mau odor e peri-implantite clinicamente observados.

Orsini et al. em 2000 relataram reações teciduais, fluidos e inflamações bacterianas em implantes removidos em autópsia. Uma paciente de 72 anos de idade foi submetida a instalação de 2 implantes. Após 5 meses a paciente sofreu um derrame cerebral e uma secção do bloco da mandíbula onde continham os implantes foi realizada. Um *gap* de 1 a 5 µm foi encontrado entre o implante e o parafuso de cobertura (*cover*) e esse espaço estava preenchido por bactérias e cálculo dental. Bactérias também estavam presentes na maior parte da porção interna do implante.

Um infiltrado inflamatório estava presente nos tecidos peri-implantares. Os autores concluíram que os dados histológicos obtidos através dessa autópsia podem confirmar a penetração de fluidos e bactérias na porção interna dos implantes relatados em estudos *in vitro* e *in vivo*

Segundo Piattelli et al., em 2001, na comparação de infiltração bacteriana em implantes parafusados e cimentados, em condições *in vitro* de 12 implantes parafusados e 12 cimentados, imersos em grupos de azul de toluidina e meio de cultura com bactérias *Pseudomonas Aeruginosa*. A pesquisa foi realizada em 3 etapas: microscópico de varredura eletrônica, análise de penetração de fluido, e análise de penetração bacteriana. Em todos os implantes parafusados observou-se penetração bacteriana na interface pilar-implante, e nos implantes cimentadas não foram detectadas as bactérias na parte interna do implante. Concluiu-se que os implantes cimentados oferecem um resultado melhor em termo de permeabilidade bacteriana e de fluido, em comparação aos implantes parafusados, uma vez que oferecem o cimento como a barreira mecânica.

Em 2002, Todescan et al. realizaram estudo histomorfométrico em cães para avaliar a influência do *microgap* em tecidos moles e duros. Extrações de todos os pré-molares das mandíbulas de 4 cães foram realizadas e um período de 3 meses de regeneração óssea foi aguardado. Vinte e quatro implantes do sistema Branemark foram colocados em 3 profundidades diferentes: G1 – implante posicionado 1 mm acima da crista óssea, G2 – implante posicionado no nível da crista óssea, G3 – implante posicionado 1mm abaixo da crista óssea. Os cortes dos implantes e tecidos moles e duros adjacentes foram processados e avaliados com as seguintes medições: comprimento da mucosa peri-implantar, comprimento do epitélio juncional, comprimento do tecido conjuntivo, primeiro contato do osso no implante, altura da conexão pilar-implante e nível da crista óssea. Nos resultados, concluíram que não houve aumento da perda óssea quando o *microgap* entre pilar e implante é posicionada abaixo da crista óssea.

Em 2005, Callan et al. realizaram estudo *in vivo* utilizando análise de DNA por sondagem para determinar se as bactérias periodonto patogênicas habitam as superfícies internas e/ou as roscas dos cicatrizadores da interface pilar-implante. Um total de 54 implantes (24 na maxila e 30 na mandíbula) de fabricantes variados, foram

instalados nos pacientes. O período de reabertura aguardado para instalação dos cicatrizadores foi de 5 meses, e então, aguardou-se mais 25 dias para a coleta dos dados microbianos. Com a utilização de cones de papel estéreis, coletou amostras das superfícies internas de 43 implantes, e das espiras dos parafusos de pilares protéticos de 11 implantes foram colhidas. As amostras foram submetidas a análise de DNA por sondagem para a identificação das seguintes bactérias: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivallis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. Todas as amostras obtidas dos parafusos dos pilares (n = 11) foram negativas (menor que 0,1% do total). Em contraste, 100% das amostras da porção interna das interfaces entre os pilares e implantes (n = 43) foram positivas para um ou mais microrganismos. Não houve diferença entre a colonização de uma espécie individual de microrganismos quando se comparou as diferentes regiões de localização dos implantes. Os autores concluíram que níveis moderados a altos de 8 diferentes microrganismos periodontopatogênicos habitam a parte interna de implantes. Os microbianos colonizaram essas superfícies em 25 dias, após o segundo estágio cirúrgico. Segundos os autores, os resultados suportam os de outras investigações que mostraram a passagem das bactérias da dentição residual para os implantes.

Dibart et al. (2005), através de um estudo *in vitro*, avaliaram o selamento bacteriano entre pilar-implante no sistema cone morse. Vinte e cinco implantes e vinte e cinco pilares protéticos foram divididos em 2 grupos para 2 fases do experimento: Na primeira fase foi testado a capacidade do vedamento do implante para impedir a entrada das bactérias vindas de fora para dentro do conjunto. Para isso, 10 conjuntos pilar-implante foram submersos em um caldo bacteriano pelo período de 24 horas. Os pilares foram então separados dos implantes e a presença bacteriana foi avaliada usando microscopia eletrônica de varredura. E na segunda fase foi testado a capacidade do vedamento do implante para impedir a saída das bactérias que estavam presentes dentro do conjunto. Para tal, os pilares testados foram inoculados com uma gota de gel bacteriano e devidamente conectados aos implantes. Esses conjuntos foram incubados em caldo nutriente por 72 horas e avaliada em microscópio eletrônico de varredura para avaliar a presença de bactérias. Não foram detectadas bactérias em nenhuma das duas fases do experimento. Os autores

concluíram que o selamento proporcionado pelo desenho do travamento cônico tem demonstrado ser hermético em relação a infiltração bacteriana *in vitro*.

Em 2005, Scarano et al. realizaram estudo durante um período de 16 anos, avaliando 272 implantes com pilares parafusados ou cimentados, removidos por diferentes causas. Nos implantes com pilares parafusados, um *microgap* de 60 μm foi encontrado na conexão pilar-implante. O contato entre as roscas do implante e as roscas do pilar estava limitado em poucas áreas. Bactérias estavam frequentemente presentes nos *microgaps* entre pilares e implantes e na porção interna dos implantes. Já nos implantes com pilares cimentados, um *microgap* de 40 μm foi encontrado na interface, e danos mecânicos não foram observados e todos os espaços internos estavam completamente preenchidos pelo cimento. Nenhuma presença bacteriana foi observada nem na porção interna do implante, nem no nível dos *microgaps*. A diferença nos tamanhos dos gaps encontrados entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os autores concluíram que em implantes com pilares retidos por parafusos, o *microgap* pode ser um fator crítico para a colonização bacteriana, enquanto que em implantes com pilares retidos por cimentação, todo o espaço interno era preenchido por cimento. Os autores também ressaltam que nesse estudo o tamanho do *gap* foi notoriamente variável e muito maior do que os observados *in vitro*.

Furst et al. (2007), através de estudo para avaliar a colonização bacteriana imediatamente após a instalação de implante dentário, e concluíram que essa colonização ocorre 30 minutos após a colocação do implante, e que o padrão de colonização precoce diferiu entre superfícies do dente e do implante. Os autores coletaram amostras de placas bacterianas subgingivais das superfícies dos dentes adjacentes e dos implantes, antes da cirurgia, 30 minutos após, 01, 02, 04, 08 e 12 semanas após a cirurgia. As amostras foram analisadas através do método de hibridização de DNA, que determina o grau de semelhança genética entre combinações de sequências de DNA. Comparando a carga bacteriana nos sítios do implante 30 minutos após a instalação e 1 semana após. Os resultados mostraram que somente os níveis de *Veillonella parvula* diferiram com maior carga bacteriana 1 semana após a cirurgia.

Em 2008, do Nascimento et al. avaliaram a infiltração bacteriana na interface pilar-implante entre componentes pré-fabricados e fundidos. Vinte implantes de conexões de hexágono externo (HE) do sistema Brånemark® (Nobel Biocare AB, Gothenburg, Sweden) foram divididos em dois grupos: 10 amostras com componentes pré-fabricados com base em cobalto-cromo e parte superior plástica que foi fundida em liga de níquel-cromo, e 10 amostras com componentes totalmente plásticos que foram fundidos em liga de níquel-cromo. Sob condições estéreis, a parte interna dos implantes foi inoculada com 3,0 µL de suspensão de *Fusobacterium nucleatum*. Após isso, os componentes eram conectados sob um torque de 32N e então submersos em 5 mL de caldo soja tripticaseína (TSB) e incubados em condições anaeróbias a 35 °C durante 14 dias. Os autores encontraram a mesma porcentagem de infiltração para ambos os grupos (11,11%) e concluíram que os dois tipos de componentes utilizados permitiram baixo percentual de infiltração bacteriana quando conectados a implantes HE sem aplicação de carga.

Em 2009, Tesmer et al., realizaram estudo *in vitro* para verificar a influência da geometria das conexões pilar-implante na contaminação bacteriana. Foram utilizados 30 implantes, divididos conforme suas conexões (HE, HI e CM). Os pilares foram conectados aos implantes imersos em solução bacteriana contendo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, sendo cultivadas de formas diferentes, conforme suas características. Os grupos foram incubados a 37°C por 5 dias, em condições anaeróbicas. Após o desparafusamento das conexões, foram colhidas amostras das porções mais apicais dos pilares, que foram preparadas em lâminas em meio ágar (AB). Essas lâminas foram incubadas a 37°C em CO₂ a 10% por 7 para *A. actinomycetemcomitans* e 2 dias para *P. gingivalis*. Como resultado, obtiveram que 3 das 10 amostras do grupo CM, desenvolveram 1 UFC (unidade de formação de colônia) de *A. actinomycetemcomitans*, enquanto no grupo 2 não foi desenvolvido nenhuma bactéria. E 10 dos 10 implantes dos grupos HE e HI desenvolveram UFC para *A. actinomycetemcomitans*, e 9 de 10 implantes, para *P. gingivalis*. Concluíram que esse estudo indica que diferentes designs dos implantes podem afetar potencialmente a colonização bacteriana das conexões, através de seus *microgaps*.

Aloise et al. (2010) realizaram estudo *in vitro* avaliando a microinfiltração na interface de pilares-implantes do tipo cone morse. O objetivo do estudo foi avaliar e comparar a frequência da infiltração bacteriana de *Streptococcus sanguinis* ao longo da interface pilar-implante de dois sistemas de implantes do tipo cone morse, o Bicon® (Boston, MA, EUA) e o Ankylos® (Dentsply Friadent, Mannheim, Alemanha). Esses dois sistemas possuem diferentes formas de ativação dos pilares: batido (Bicon®) e parafusado (Ankylos®). Vinte conjuntos pilar-implante esterilizados foram utilizados e anexados de acordo com o fabricante: 10 Bicon® e 10 Ankylos®. Estes foram totalmente imersos em 20 tubos de ensaio contendo solução nutritiva BHI (Brain Heart Infusion). Na parte interna dos 20 implantes, foram inoculados 0,1 µL de *Streptococcus sanguinis* e então os pilares foram conectados. Os conjuntos foram então incubados sob condições anaeróbias em autoclave a 37 °C durante 14 dias e foram avaliados diariamente para a verificação da turvação do meio que é um indicativo da presença de microinfiltração bacteriana. Os autores encontraram uma taxa de 20% de infiltração bacteriana nos dois sistemas, não havendo diferenças estatísticas significativas entre eles. Concluíram que tanto para o sistema parafusado, quanto para o sistema batido, houve o mesmo índice de infiltração bacteriana.

Em 2010, Deconto et al. realizaram uma análise *in vitro* a fim de comparar o selamento bacteriano na interface pilar-implante de dois modelos de pilares do tipo CM. Vinte e dois conjuntos de implante-pilar foram divididos em 2 grupos: S - pilares do tipo sólido e P - pilares de parafuso passante. Para cada grupo, adicionou-se 2 conjuntos para o controle positivo e negativo de contaminação. Na porção interna dos implantes, foi inoculado 0,3 µL de suspensão de *Escherichia Coli* na concentração de 108 UFC/ml, e então os pilares foram conectados e torquados com 20N para o grupo S e 10N para o grupo P, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras eram então submersas em 5 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas em estufa a 37 °C por 7 dias em acompanhamento diário da turvação do caldo. Após a incubação, as colônias foram contadas. Os autores não encontraram diferença estatística significativa entre os grupos P e S com relação ao número de colônias e nem ao percentual de infiltração.

D'Ercole et al. em estudo *in vitro* realizado em 2011, avaliaram a contaminação bacteriana entre implantes com conexões de hexágono externo e

implantes de conexões cônicas (CM). Um total de 20 conjuntos pilar-implante foram utilizados nessa pesquisa, divididos em 2 grupos (n = 10): grupo 1 - implantes de conexão cônica, grupo 2 - implantes de conexão de hexágono externo. A parte interna de 5 implantes por grupo foi inoculada por suspensão de *Pseudomonas aeruginosa*, e os 5 implantes restantes de cada grupo foi inoculada com suspensão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A verificação da passagem das bactérias do interior do conjunto para o meio externo era avaliada pela turvação do caldo. No grupo 1, 3 de 5 amostras apresentaram infiltração bacteriana com inoculação de *P. aeruginosa*, e 2 de 5 amostras apresentaram infiltração com inoculação com *A. actinomycetemcomitans*. No grupo 2, contaminação bacteriana foi encontrada em 4 de 5 amostras inoculadas com *P. aeruginosa*, e 4 de 5 amostras inoculada com *A. actinomycetemcomitans*, gerando um total de 8 conjuntos com microinfiltração. Os autores relataram que os dados apresentados confirmam os relatos de infiltração bacteriana dos implantes com pilares parafusados, e de baixas taxas de infiltração das conexões do tipo cônicas, embora os resultados não foram estatisticamente significantes.

Koutouzis et al. (2011) avaliaram a colonização bacteriana na interface pilar-implante com aplicação de carga. Vinte e oito implantes foram divididos em 2 grupos variando o desenho das conexões cônicas dos implantes e dos componentes protéticos: G1 – conexão interna do tipo cone morse com pilar protético de 6 mm de altura torqueados a 25N, e G2 – conexão interna do tipo cônica com 4 canais de encaixe, com multibase e pilar de 4 mm de altura torqueados a 35N. O teste de carga foi realizado em um simulador de desgaste com um dispositivo confeccionado com dois cilindros, o primeiro de diâmetro maior, confeccionado de aço inoxidável, no qual 10 amostras eram fixadas com resina acrílica e o segundo cilindro (antagonista), de diâmetro menor, feito de teflon era pressionado contra os conjuntos pilar-implante com uma força de 15N. Um total de 500.000 ciclos foi aplicado, correspondendo, segundo o autor, a 2 anos de função clínica. Durante o teste, os dois cilindros foram submersos em 250 mL de suspensão contendo *Escherichia coli*. Após isso, os pilares foram desconectados dos implantes o destorque foi medido. Amostras de microrganismos foram coletadas das roscas internas dos implantes com swabs estéreis que em seguida foram plaqueadas e incubadas para detecção e contagem de UFC/mL de *Escherichia coli*. Uma amostra no G1 e 12 amostras no G2 apresentaram crescimento

de *E. coli*. Os implantes do G1 apresentaram um aumento no valor do torque de remoção, enquanto que no G2, esse valor diminuiu. Os autores concluíram que a diferença no desenho das conexões pode afetar o potencial de infiltração bacteriana na interface pilar-implante sob aplicação de carga.

Teixeira et al. (2011) realizaram estudo comparativo *in vitro* para avaliar a microinfiltração bacteriana direta e indireta em implantes de dois estágios. Os autores dividiram o experimento em implantes de conexão cônica e hexágono interno. Para isso, vinte implantes e pilares de conexão cônica foram divididos em dois grupos: Grupo A – avaliação da microinfiltração do meio externo para dentro do implante; Grupo B – avaliação da microinfiltração da parte interna do implante para o meio externo. Outros vinte implantes do tipo hexágono interno foram divididos em dois grupos: Grupo C - avaliação da microinfiltração do meio externo para dentro do implante; Grupo D - avaliação da microinfiltração da parte interna do implante para o meio externo. Para a avaliação do meio interno para o externo, os conjuntos tiveram sua porção interna inoculada com *Staphylococcus aureus* e foram incubados em caldo BHI por uma semana. Para a avaliação da passagem das bactérias do meio externo para a porção interna, cada conjunto pilar-implante foi individualmente submerso em 4 mL de suspensão contendo *Staphylococcus aureus* e incubados por 2 semanas. A microinfiltração bacteriana ocorreu em todos os grupos e não houve diferença estatística significativa na comparação entre os grupos A e C, e B e D. Os autores concluíram que a microinfiltração *in vitro* de *Staphylococcus aureus* através da interface implante-pilar ocorreu com os dois tipos de conexão protética: hexágono interno e cone-morse

Assenza et al. (2012) avaliaram em estudo *in vitro*, a infiltração bacteriana em implantes com diferentes conexões protéticas. Foram utilizados 30 implantes para esse estudo, os quais foram divididos em 3 grupos (n = 10): grupo 1 - conexão parafusada, grupo 2 - conexão cimentada e grupo 3 – cone-morse. A parte interna da metade das amostras de cada grupo foi inoculada com suspensão da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e a outra metade com suspensão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A passagem da bactéria de dentro do implante para o meio externo era determinada pela turvação do caldo. Os resultados encontraram contaminação bacteriana em 6 de 10 amostras do grupo 1, e em nenhuma amostra

do grupo 2 e em 1 amostra do grupo 3. Diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo 1 e 3 ($p < 0,05$), e entre o grupo 1 e 2 ($p < 0,01$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo 2 e 3 ($p > 0,05$). Os autores concluíram que o estudo confirmou os resultados precedentes quanto ao vedamento hermético dos conjuntos pilares-implantes cimentados: a baixa infiltração bacteriana dos cone-morse e a alta incidência de infiltração bacteriana em conexões parafusadas.

Do Nascimento et al. (2012) por meio de estudo *in vitro*, avaliaram a infiltração de saliva através da interface pilar-implante em 3 diferentes conexões sob condições de carga e sem carga. Sessenta implantes foram utilizados: 20 de hexágono externo, 20 de hexágono interno e 20 de cone morse, que foram subdivididos em 2 grupos de 10 amostras cada – com e sem aplicação de carga. A saliva foi coletada de 5 pacientes adultos adicionadas de contaminação das amostras sem aplicação de carga: os conjuntos pilar-implante foram conectados a torque de 20N e imersas em tubo contendo 200 μ L de saliva. Contaminação das amostras com aplicação de carga: trinta cilindros plásticos com base de cobalto-cromo foram utilizados para fundir 30 coroas idênticas, utilizadas para aplicação de carga, e uma carga de 120N foi aplicada em um total de 500.000 ciclos a 1.8 Hz. A saliva foi mantida a 37 °C. Após 7 dias de incubação, o conteúdo interno de todas as amostras foi coletado e avaliada por meio da técnica de hibridização de DNA *checkerboard*. Foram encontrados microrganismos presentes na superfície interna de todos os grupos, porém os grupos com implantes do tipo cone morse, apresentou resultados com menores valores de infiltração tanto quando submetidos a carga quanto não submetidos. Entretanto, os valores de infiltração bacteriana de todos os grupos aumentaram quando submetidos a aplicação de carga.

Em 2012, Silva-Neto et al. realizaram estudo *in vitro* relacionando a microinfiltração bacteriana na interface entre pilares e implantes de hexágono externo com diferentes torques dos componentes. Na primeira fase do experimento, 9 conjuntos de pilares e implantes ($n = 3$) foram inoculados com diferentes volumes de suspensão com *Escherichia coli*, e o torque recomendado pelo fabricante foi dado. Na segunda fase, 27 conjuntos foram inoculados com 0,5 μ L da suspensão bacteriana e divididos em 3 grupos ($n = 9$) de acordo com o torque de aperto: T10-10N, T20-20N e T32-32N. As amostras foram imersas em caldo BHI e incubadas durante 14 dias.

Nesse período, a turvação do caldo foi avaliada diariamente e ao final do período, a viabilidade das bactérias foi testada. Os resultados encontrados durante a primeira fase foram que após 24 horas, todos os conjuntos apresentaram turvação do caldo, que foi interpretado pelos autores como transbordamento da suspensão. Sendo assim, na segunda fase do experimento, foi padronizada a utilização de 0,5 µL da suspensão. Durante as primeiras 24 horas, 2 amostras do grupo T10 e 1 amostra do grupo T20 apresentaram turvação do caldo indicando a microinfiltração bacteriana. Nenhuma amostra do grupo T32 apresentou turvação do meio. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Os autores concluíram que os diferentes torques não influenciaram estatisticamente a microinfiltração bacteriana, no entanto, apenas as amostras com torque de 32N não apresentaram nenhuma contaminação. Em relação a quantidade bacteriana, o estudo demonstrou que um volume de 0,5 µL de suspensão é a quantidade ideal para prevenir transbordamento, causando resultados falso positivos.

Tripodi et al. (2012), avaliaram *in vitro*, a contaminação bacteriana em interface pilar-implante de cone morse e hexágono interno. Utilizaram 2 grupos de implantes com $n=10$ /grupo em cada um (grupo 1 - CM e grupo 2 - HI). Utilizaram duas espécies de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Cinco implantes tiveram seu interior inoculado com cultura de *P. aeruginosa* e 5 com cultura de *A. actinomycetemcomitans*, em condições estéreis e parafusados com seus pilares. Como controle positivo, 2 tubos receberam 1 µL de *P. aeruginosa* e de *A. actinomycetemcomitans*, respectivamente, em meio de cultura, e no controle negativo, 2 tubos receberam apenas meio de cultura estéril. Como resultado, obtiveram, nas interfaces pilar-implante de CM, 2 implantes contaminados com *P. aeruginosa*. Nas amostras contaminadas com *A. actinomycetemcomitans*, nenhuma contaminação foi observada. Nas interfaces pilar-implante do HI, duas contaminações por *P. aeruginosa* foram encontradas. Nas interfaces pilar-implante do hexágono interno, inoculadas com *A. actinomycetemcomitans*, 3 amostras foram contaminadas. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre interface pilar-implante dos CM e HI. Os autores concluíram que há contaminação bacteriana nos diferentes tipos de interfaces, mesmo que com diferentes porcentagens.

Prado et al. (2016) realizaram estudo *in vitro* visando avaliar a perda do torque nas conexões e o desgaste das superfícies internas do implante pela ação do contato com o biofilme. Utilizaram 10 implantes de conexão CM. Os pilares receberam torque de 15N, conforme indicação do fabricante. Foram então colocados em infusão de saliva humana, coletada de 4 pacientes com boa saúde oral, que não fizeram uso de antibióticos nos 6 meses anteriores, por 72 horas a 37°C, em meio de CO₂ a 5%. Após remoção dos pilares, a parte interna dos implantes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica. Observaram deformação plástica e abrasão na parte interna dos implantes e alterações na sua rugosidade após contato com o biofilme. A principal conclusão foi que houve diminuição de torque nas conexões pilar-implante após contato com biofilme, porém com menor dano à superfície interna. Este estudo sugere que o biofilme tem efeito lubrificante nas interface pilar-implante, que diminui a fricção entre as superfícies de contato, podendo levar à perda do implante.

El Haddad et al. em 2016, desenvolveram um estudo *in vitro* para pesquisar a colonização bacteriana na interface pilar-implante e a penetração de bactérias no interior dos implantes, nos três tipos de conexões. Utilizaram o meio de cultura Lyzogeny Broth (LB) contendo 2 espécies de bactérias: *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, e 2 antibióticos: Kanamicina e Ampicilina, cultivados em incubadoras. No grupo experimental, alguns mL de bactérias + LB + antibióticos foram introduzidos no interior dos implantes (n=2) e no grupo controle negativo (n=2) apenas LB + antibióticos introduzidos, sendo então parafusados segundo as orientações do fabricante. Após 48 horas, os implantes foram reabertos e procedeu-se a extração de DNA e realizada a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para quantificação das bactérias. Os resultados mostraram que houve crescimento bacteriano tanto na parte interna quanto na externa dos implantes do grupo de estudo, com significativa diferença entre a concentração bacteriana no meio interno e no meio externo dos implantes. Concluíram então que nenhuma conexão conseguiu vedar totalmente as conexões e eliminar os *microgaps*, podendo as bactérias da peri-implantite serem as principais causas de falha dos implantes.

Garrana et al. (2016) realizaram um teste *in vitro* envolvendo endotoxina. Para determinar se a endotoxina pode atravessar diferentes conexões de implante-pilar foram usados vinte e sete conjuntos de implante-pilar e foram inoculados com

Escherichia coli. Seis dos vinte e sete foram conexões de hexágonos externos e 21 internos. Dos 27 implantes de hexágono externo testados, permeabilizou endotoxinas em 6 implantes. Das 21 conexões internas, 9 implantes não mostraram infiltração mensurável enquanto que os outros 12 infiltração significantes. Conclui-se então que a infiltração de endotoxina é dependente do tipo de sistema de conexões. Os implantes de Straumann® Synocta (Straumann, Basel, Switzerland), Straumann® Cross-fit (Straumann, Basel, Switzerland), e Ankylos® (Dentsply Friadent, Mannheim, Germany) exibiram os melhores desempenhos, não foram detectados infiltração de endotoxina em 7 dias.

Costa et al, (2017) realizaram estudo *in vitro* que comparou a eficácia da vedação na interface pilar-implante entre conexões de hexágono externo e hexágono interno. Doze conjuntos de implantes e pilares de hexágono externo e doze conjuntos de hexágono interno foram analisados. A falha da vedação de interface implante-pilar foi observada através de turbidez ou presença de depósitos na cultura. Dois dos dez conjuntos de HE mostraram contaminação contra nenhuma contaminação nos conjuntos de HI. Concluíram então, que os dois sistemas de conexões de implantes foram capazes de evitar infiltração bacteriana *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas ao total 45 conjuntos de pilar-implantes cônicos da marca Dentoflex® da linha Supreme (Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil), dos quais foram 15 implantes de conexões do tipo hexágono externo (HE), 15 implantes de conexões de hexágono interno (HI) e 15 implantes de conexões do tipo cone morse (CM), todos de plataforma 3,75 x 11,5 mm, mais seus respectivos pilares protéticos.

Antes de iniciar o experimento propriamente dito, foram realizados dois estudos pilotos, um para controle positivo bacteriano e outro com Blue®M (Bluem Europe BV, Zwolle, Overijssel, Netherlands), para verificar se realmente há contaminação bacteriana por *P. gingivalis* na interface implante-pilar.

4.1 Microrganismo e condições de cultura

Para a obtenção de meio de cultura de microrganismo, foi utilizada a cepa de bactérias da espécie *Porphyromonas gingivalis* (ATCC® 33277™), que foram cultivadas numa placa em meio sólido de TSA (tryptic soy agar) suplementado com extrato de levedura a 0,2% (Difco), sangue desfibrinado de carneiro 7%, 5 µg/mL de hemina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e 1 mg/mL de menadiona (Sigma) sob condições anaeróbicas, a 37 °C (10% de CO₂, 10% H₂ e 80% N₂; MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, UK) (Figura 11)

Para o ensaio de contaminação dos implantes foi utilizado o caldo TSB-BHI-HM composto de infuso cérebro coração (Brain Heart Infusion – BHI - Difco), TSB (tryptic soy broth), extrato de levedura a 0,2% (Difco), 5 µg/mL de hemina (Sigma) e 1 µg/mL de menadiona (Sigma).

As colônias bacterianas das culturas crescidas em ágar foram ressuspendidas em meio TSB-BHI-HM e incubadas por 18 horas em anaerobiose. Após o período de incubação, a turbidez foi ajustada para 0,5 de absorbância, com leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 660 nm.

4.2 Estudo Piloto 1

Dois conjuntos de pilar-implantes para cada tipo de conexão (HI, HE, CM), foram parafusados e torqueados com 32N conforme as recomendações do fabricante, em seguida foram imersos em tubos de ensaio com meio de cultura *P. gingivalis* com

densidade óptica 0,5 da escala padrão de Macfarland, seguido de diluição em meio de cultura para 5 mL sendo submetidos a agitação em um agitador ou *shaker* (Orbital Shaker 211DS, Labnet, Edison, NJ, USA) por 30 minutos, a 150 rpm (Figura 12), e depois levados à câmara de anaerobiose (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Bingley, West Yorkshire, UK) (Figura 13). Repetiu-se a agitação diariamente com a mesma intensidade e tempo. A troca do meio de inóculo é feita a cada 48 horas, durante 5 dias.

As conexões foram removidas e amostras do interior dos implantes foram coletados para realização de coloração de Gram. Foi observado através da análise de lâminas no microscópio óptico (Axiostar Zeiss, Zeiss International, Oberkochen, BW, Germany) (Figura 14) que houve contaminação em todas as amostras (Figura 15).

4.3 Estudo Piloto 2

Com o resultado positivo do primeiro estudo, um segundo estudo piloto foi realizado seguindo os mesmos procedimentos, porém com o acréscimo do Blue[®]M gel oral e clorexidina em gel no interior dos implantes. No final deste experimento, a análise microscópica de coloração de Gram também mostrou-se que houve a contaminação em todas as amostras.



Figura 11 – cultivo de *P. gingivalis* numa placa



Figura 12 - tubos de amostras no agitador Orbital Shaker 211DS
(Labnet, Edison, NJ, USA)



Figura 13 - câmara de anaerobiose MiniMacs Anaerobic Workstation
(Don Whitley Scientific, Bingley, West Yorkshire, UK)



Figura 14 - microscópio óptico Axiostar Zeiss
(Zeiss International, Oberkochen, BW, Germany)

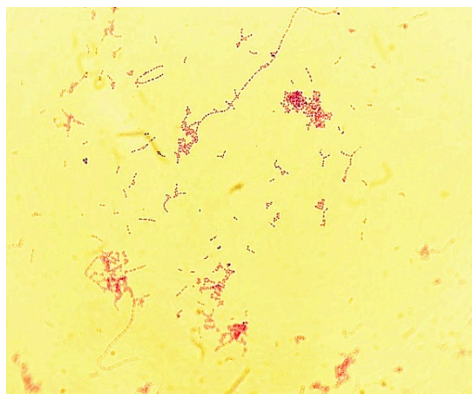
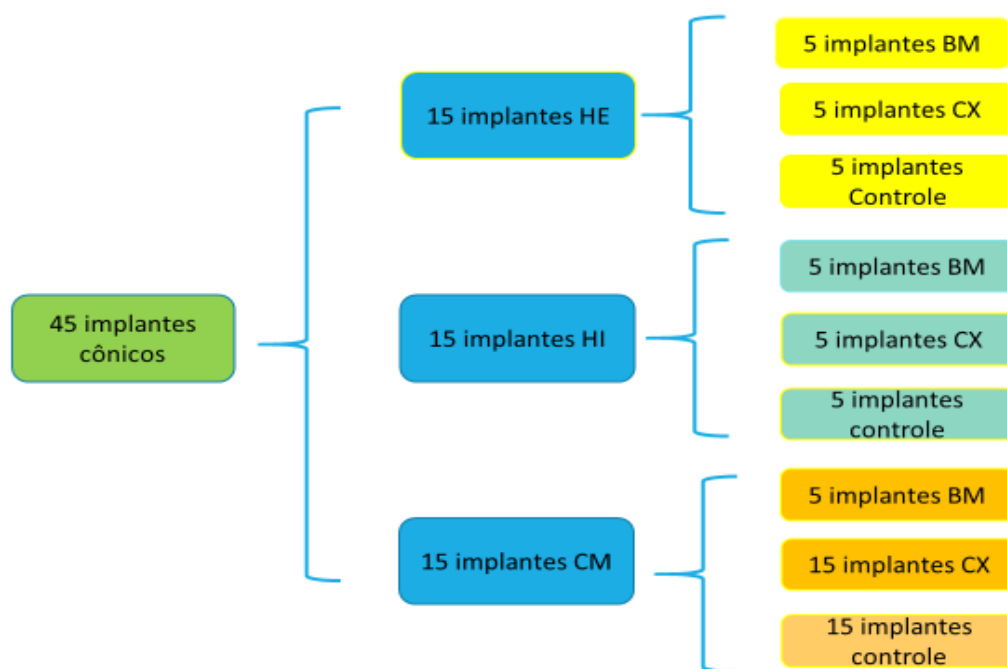


Figura 15 – Teste de coloração de Gram confirmando a contaminação de amostra com *P. gingivalis*, com aumento de 300x

4.4 - Experimento

4.4.1 Contaminação por *P. gingivalis* na interface pilar-implante

O total de 45 implantes dentários de três tipos de conexões diferentes foram divididos em três grupos, sendo que cada grupo possui cinco implantes de cada conexão (n=5/conexão/grupo): grupo Blue[®]M (BM) (n=15) grupo Clorexidina (CX) (n=15) e grupo de controle positivo bacteriano (n=15) (Fluxograma 1). Foram utilizados no ensaio de penetração de microrganismos de meio externo para o interior dos implantes através de suas conexões pilar-implante. Segurou-se o implante com um alicate ortodôntico removedor de bráquete 346R estéril (Quinelato, Rio Claro, SP, Brazil). O interior do implante foi preenchido de acordo com cada grupo: Blue[®]M gel oral (Figura 16) e Clorexidina gel 2% (Clorhexidina gel, Maquira, Maringá, PR, Brazil) (Figura 17), um volume total de 0,1 mL foram introduzidas via seringa de insulina e agulhas estéreis (Figura 18) em que preencheu até a borda dos implantes, sendo então realizada o torque na conexão pilar-implante (Figura 19), E no grupo controle positivo bacteriano, o qual os implantes foram torqueados sem preenchimento de produtos.



Fluxograma 1. Divisão de implantes por tipo de conexão e produtos



Figura 16 - Blue[®]M gel oral 15 mL
(Bluem Europe BV, Zwolle, Overijssel, Netherlands)

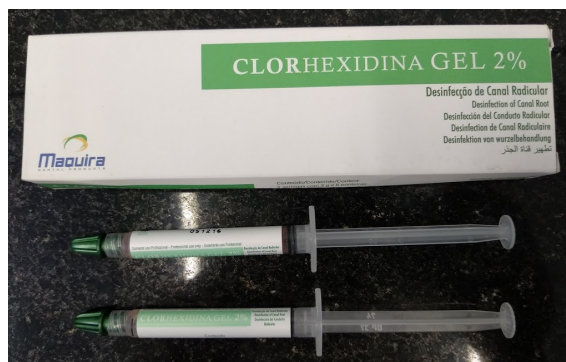


Figura 17 – Clorexidina 2% em gel 3g
(Clorhexidina gel, Maquira, Maringá, PR, Brazil)



Figura 18 – inserção de blue[®]M e clorexidina no interior do implante



Figura 19 – torqueando o pilar no implante



Figura 20 – removendo o excesso de produto com gaze estéril

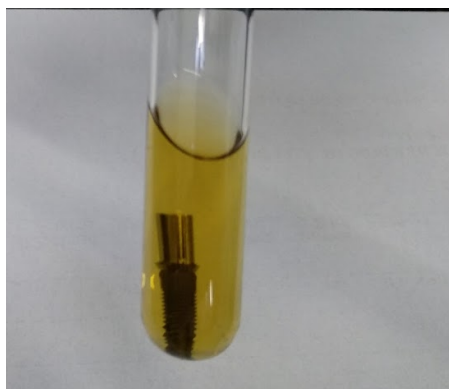


Figura 21 – tubos de ensaio contendo meio de cultura de *P. gingivalis* com implante-pilar

Após o torque na conexão pilar-implante, possíveis excessos foram removidos com gaze estéreis (Figura 20), e colocados em tubos de vidro contendo 500 μ L de inóculo bacteriano e 4,5 mL de meio TSB-BHI-HM (Figura 21). Os tubos foram submetidos à agitação no *shaker* por 2 horas a 150 rpm, numa temperatura de 37 °C, e depois foram incubados em condições de anaerobiose por 4 dias.

Durante o período de incubação, houve a troca de meio de cultura com novos inóculos bacterianos a cada 2 dias. Além disso, a cada 24 horas os tubos contendo os implantes foram submetidos a agitação no *shaker* por 2 horas.

Após 4 dias de incubação, os implantes foram retirados das culturas, lavados por submersão com soro fisiológico 0,9% estéril. Foram então abertos, e com auxílio de um microbrush estéril, esfregou o interior do implante removendo todo o conteúdo e transferido para um tubo de poliestireno (ependorf) contendo solução salina

tamponada de fosfato (PBS) (Figura 22). O microbrush também ficou submerso na solução por 10 segundos (Figura 23). O interior do implante foi lavado com 10 μ L da solução de PBS que foi transferido para um tubo contendo 485 μ L de PBS. As amostras foram congeladas num freezer a -20°C para a extração e purificação de DNA e análise por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real).



Figura 22 – esfregação no interior do implante com microbrush para remoção do conteúdo.



Figura 23 – O microbrush com o resto do esfregação submerso na solução PBS por 10 segundos.

4.3.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA (purificação genômica), utilizou-se o Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Para se preparar os lisados de células bacterianas Gram negativas, preparou-se o bloco de calor a 55°C (Banho Seco - Ambiente a 100°C, Uniscience, Osasco, SP, Brazil) (Figura 24), utilizando o *pellet* de células congeladas (Figura 20). O *pellet* de células em 180µL de PLGDB foi ressuspendido. Acrescentou-se 20 µL de Proteinase K para lisar as células. Após breve mistura em *vórtex*, incubou o tubo ao banho seco a 55°C, com ocasionais *vórtex*, até se completar a lise (de 30 min a 4 h). Acrescentou-se então 20 µL de RNase ao lisado, misturando com *vórtex* e o incubou à temperatura ambiente por 2 min.

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

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

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

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

A *spin column* foi então alocada em tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml, onde acrescentou-se 25-200 µL de PureLink Genomic Elution Buffer (PLGEB) à coluna. Após incubação por 1 minuto a temperatura ambiente, a *spin column* foi

centrifugada a velocidade máxima por 1 min a temperatura ambiente. O DNA purificado foi armazenado a -20°C .



Figura 24 – Banho Seco a 55°C (Ambiente a 100°C , Uniscience, Osasco, SP, Brazil)

4.4.3 Detecção e quantificação da contaminação por *P. gingivalis* da interface pilar-implante por qPCR

A quantificação e identificação das bactérias pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi feita utilizando o kit TaqMan Assays (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), segundo as instruções do fabricante.

Conforme proposto por Nonnenmacher et al., em 2004, os primers e sondas utilizados para a detecção e quantificação de periodontopatógenos são apresentados na Tabela 1. Os primers e sondas (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) foram selecionados usando o Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems International, Foster City, Califórnia, USA) e foram baseados em regiões altamente conservadas específicas de espécies de *P. gingivalis* do gene 16S rRNA.

As amostras foram testadas em uma mistura de reação 25- μL contendo 2,5 μL de DNA molde, 2,5 μL de TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG, 1,5 μL de MgCl_2 , 1 μL dNTP, 12,5 pmol de Custom TaqMan® Primer e 3,75 pmol da sonda Custom TaqMan® TAMRA. No ciclismo as condições utilizadas foram as seguintes: 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min cada. Nesse processo foi utilizado o Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) para a amplificação por PCR

em tempo real monitorado, analisando quantitativamente as emissões de fluorescência. O sinal do corante repórter (FAM) foi medido em relação ao corante de referência (ROX) como presente na mistura principal de PCR para normalizar as flutuações de fluorescência não relacionadas com a PCR ocorrendo de poço para poço.

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

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

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações entre diferentes grupos se conexões utilizando o software estatístico Graphpad (Graphpad Software inc., San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

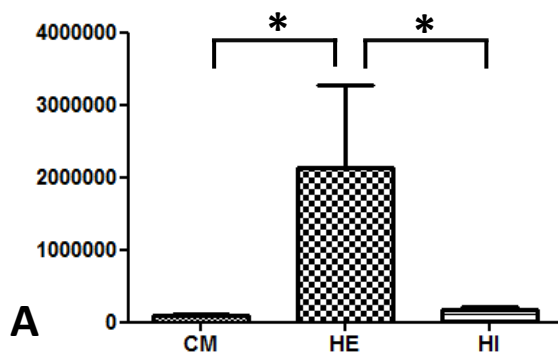
Quantificação da contaminação por *P. gingivalis* da interface implante pilar pelo qPCR

Todos os implantes apresentaram contaminação na interface do pilar-implante por *P. gingivalis* após 4 dias de incubação (Fig. 25 e Fig. 26). As médias da quantificação absoluta de *P. gingivalis* das amostras estão dispostas na tabela 2.

Tabela 2. Quantificação absoluta de *P. gingivalis* nas diferentes conexões pilar-implante dos grupos experimentais.

Grupos	CONTROLE			BLUE [®] M			CLOREXIDINA		
	CM	HE	HI	CM-BM	HE-BM	HI-BM	CM-CX	HE-CX	HI-CX
Médias	93774	2560718,80	171416,63	21857,59	73924,57	53708	4278,13	201120,44	29925,50
Desvio Padrão	71486,4	2906951,3	131308,8	50018,6	123701,6	16446,8	1120,7	339112,0	24151,1

Em todos os grupos, observou-se que as amostras coletadas das conexões de HE apresentaram maior contaminação por *P. gingivalis*, seguido de HI e CM, sendo estatisticamente significativa no grupo controle ($p=0,0457$) e no grupo CX ($p=0.018$). Enquanto a conexão do tipo CM apresentou menor quantidade microbiana em todos os grupos, sendo estatisticamente diferente no grupo Controle ($p=0,045$) e no grupo Clorexidina ($p=0.018$) (Figura 25).



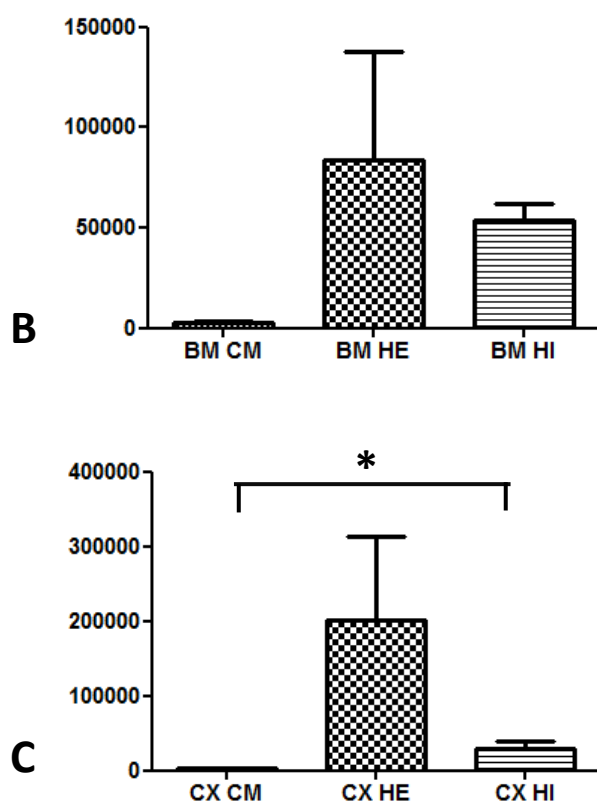


Figura 25 - Comparação da quantificação de *P. gingivalis* entre as diferentes conexões dentro mesmo grupo.

(A) Grupo Controle.

(B) Grupo Blue[®]M.

(C) Grupo Clorexidina.

*diferença estatística p<0,05.

Em relação aos tratamentos com produtos observou-se que ambos os produtos BlueM[®] e Clorexidina diminuíram infiltração do *P. gingivalis* na interface pilar implante em todos os tipos de conexões.

Na conexão cone morse os tratamentos com BM e CX reduziram a contaminação por *P. gingivalis*, respectivamente p= 0,011 e p=0,0001. (Figura 26)

Na conexão HE foi observada diferença estatística entre grupo controle e BM p=0,029.

Na conexão HI houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e Clorexidina (p=0,006)

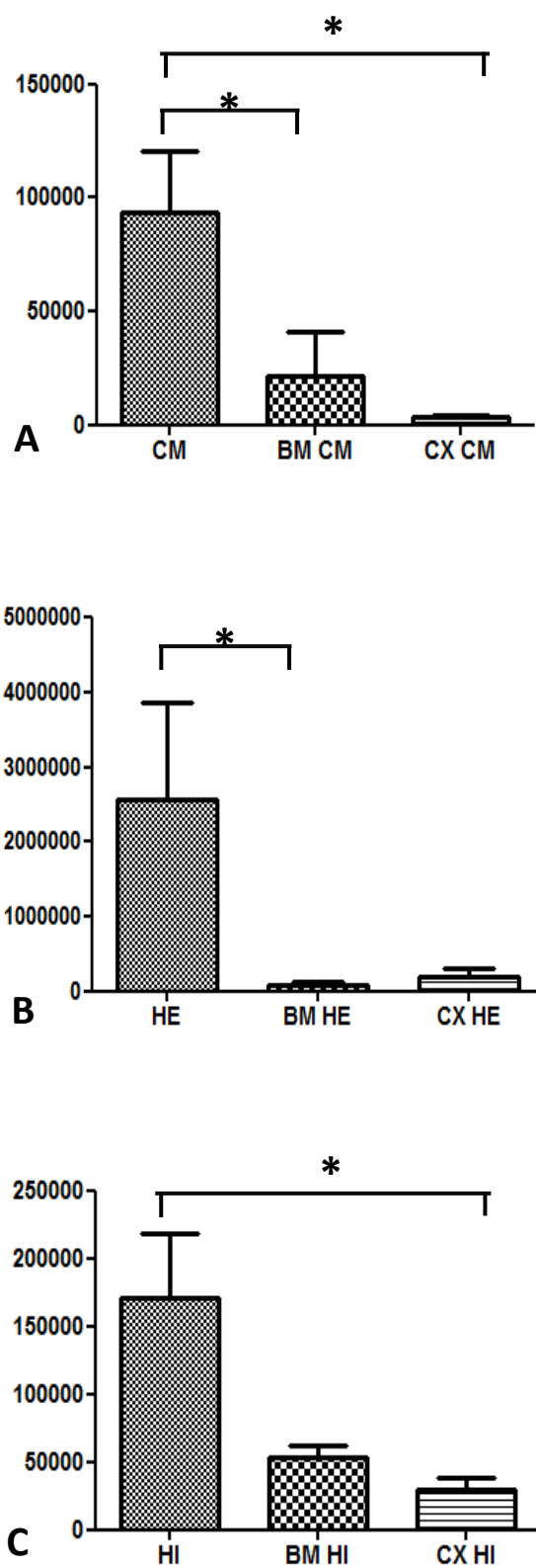


Figura 26 - Comparação da quantificação de *P. gingivalis* dos mesmos tipos de conexões entre os grupos.

(A) Conexão do tipo CM. (B) Conexão do tipo HE. (C) Conexão do tipo HI.

*diferença estatística $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Uma das grandes dificuldades na implantodontia a ser vencida é a peri-implantite, pois ela pode causar o insucesso na reabilitação oral do paciente. A implantodontia tem buscado diversas novas técnicas, tecnologias e produtos para prevenir e combater a peri-implantite (Buchs et al., 1995, Malo et al., 2008, Marchack et al., 2005)

Dos três tipos de conexões pesquisadas neste trabalho, o vedamento da conexão HE, apresentou o pior resultado em todos os grupos. Nessa conexão, a quantidade das bactérias que infiltrou para o interior do implante no grupo controle foram 14 vezes mais do que na conexão HI e 27 vezes mais que a conexão de cone morse, em número absoluto da quantidade de bactérias. Esse resultado é semelhante quando foi utilizado o Blue[®]M e Clorexidina, a infiltração bacteriana sempre é maior no HE, seguida de HI e por último o CM (Tab. 2). Os implantes do tipo HE, pela geometria da conexão pilar-implante, apresentam o maior *microgap* entre as três conexões, e por isso a grande quantidade das bactérias periodontopatógenas infiltradas. Essa deficiência pode-se tentar ser suprida com o uso de antisséptico em suas conexões, que impede significativamente a penetração bacteriana (Tesmer et al., 2009, D'Ercole et al., 2100, Faria et al., 2011., do Nascimento et al., 2018)

Com os resultados acima, pudemos confirmar o que vem relatado na literatura, que nas conexões de cone morse, o vedamento é melhor e o *microgap* é menor, e conseqüentemente a infiltração bacteriana é diminuída, e com auxílio das novas tecnologias para a melhora do implante, pode-se minimizar o efeito do peri-implante (Aloise et al., 2010, Deconto et al., 2010, D'Ercole et al., 2011, Faria et al., 2011)

Verificamos também que em qualquer uma das conexões, quando preenchido com Blue[®]M e clorexidina, a infiltração bacteriana diminui. Isso também confirma com o que a literatura tem descrito. Existem na literatura muitos outros produtos usados na interface pilar-implante com a mesma finalidade, como o iodofórmio, hidróxido de cálcio e outros (Cottone et al., 1987; Molinari et al., 1988; Molinari et al., 1991; Fernandes et al., 2013). O iodofórmio é uma substância amarelo claro, altamente radiopaca e solúvel em água. Sua solubilidade em contato com líquidos orgânicos, libera lentamente o iodo, que confere sua capacidade antisséptica.

Era muito comum o seu uso na endodontia para obturação do conduto, pela sua característica antisséptica e radiopacidade. Porém, com o tempo caiu em desuso pelas reações adversas e tóxicas que pode causar para pacientes com alergia ao iodo. Existe no mercado a pasta Proheal® (BiomacMed, Juiz de Fora, MG, Brasil) que tem na sua composição o iodo como o seu princípio ativo, para preenchimento na conexão pilar-implante. Porém, os poucos estudos relacionados a sua eficácia na implantodontia têm impedido a sua difusão entre os profissionais da área.

Após a busca e análise da literatura, certificamos que existem pouquíssimos trabalhos que comprovam sobre a eficiência dos produtos do Blue®M, e este é o primeiro trabalho realizado na literatura sobre o uso do Blue®M para verificar a sua eficiência antisséptica na interface do pilar-implante para prevenção da contaminação bacteriana.

Verificamos que tanto o uso do Blue®M como a clorexidina, diminuiu significativamente a contaminação bacteriana na interface pilar-implante nos três tipos de conexões, quando comparado com o grupo do controle negativo. O efeito da Blue®M de acordo com os nossos resultados, foi igual a clorexidina em todas as conexões reduzindo a quantidade de *P. gingivalis*.

A clorexidina, que já tem seu uso e eficiência pesquisada e comprovado na literatura mundial, é o padrão ouro dos antissépticos e usado como controle positivo neste trabalho (Kluk E et al., 2016). Ela é um antisséptico químico de amplo espectro de ação e baixa toxicidade, e possui efeito antifúngico e bactericida, capaz de eliminar tanto as bactérias gram-positivas quanto negativas. Na cavidade bucal, causa algum efeito adverso como distúrbio no paladar e manchamento da língua e dos dentes (Makeeva et al., 2014)

O blue®M, nesta pesquisa, foi eficaz na diminuição da infiltração bacteriana na interface pilar-implante. O mecanismo de ação do produto pode ser via a liberação gradual do oxigênio ativo, agindo no metabolismo das bactérias e também, presença de lactoferrina sua composição, que é uma proteína com ação antioxidante e antibacteriana. É importante ressaltar que na sua formulação não contém nenhum agente anti-bacteriano, e com isso não causa nenhuma reação adversa, como hipersensibilidade, toxicidade e resistência bacteriana. Além disso, apresenta um alto poder cicatrizante e anti-inflamatório, pela penetração de uma alta concentração de

oxigênio nos tecidos alcançando as regiões mais profundas, onde atua sobre as bactérias. Pode ser utilizado em diversos tipos de problemas bucais, como na inflamação e sangramento gengival, peri-implantite, nos cuidados pré e pós cirurgia de implantes, em úlceras bucais, nas bolsas periodontais ao redor dos dentes e implantes, após extrações dentárias ou feridas por uso de prótese, e pode ser usado nos ferimentos causados após quimioterapia e radioterapia.

Acreditamos que mais estudos sobre Blue[®]M são necessários, para verificar não somente a capacidade quantitativa de impedir a infiltração bacteriana, mas também sobre as propriedades do produto, como a solubilidade, tempo de degeneração, e outros.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que há contaminação bacteriana em todos tipos de conexões na interface pilar-implante. A aplicação do Blue[®]M diminuiu a infiltração bacteriana por *P. gingivalis* através do *microgap* da conexão pilar-implante de forma comparável a clorexidina, de forma comparável à clorexidina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV on dental implants. In: Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. Lang NP, Karring T, editors. London: Quintessence Publishing Co; 1994. p. 365-9.

Alcoforado G, Redinha L. Reabilitação com implantes endo-ósseos, in Redinha L (ed), 2008.

Aloise JP, Curcio R, Laporta MZ, Rossi L, da Silva AM, Rapoport A. Microbial leakage through the implant-abutment interface of Morse taper implants in vitro. Clin Oral Implants Res. 2010;21(3):328-35.

Annibali S, Bignozzi I, Cristalli MP, Graziani F, La Monaca G, Polimeni A. Peri-implant marginal bone level: a systematic review and meta-analysis of studies comparing platform switching versus conventionally restored implants. J Clin Periodontol. 2012;39(11):1097–113.

Araújo CRP. Estudo da precisão e fidelidade da técnica radiográfica convencional na avaliação do comportamento ósseo marginal em implantes Cone Morse e Hexágono Externo inseridos imediatamente e tardiamente à extração e submetidos à carga imediata em cães. Tese de Doutorado. 2017. Patologia Ambiental e Experimental. 2017.

Assenza B, Tripodi D, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G, et al. Bacterial leakage in implants with different implant-abutment connections: an in vitro study. J Periodontol. 2012; 83(4):491-7.

Berglundh T, Lindhe J, Lang N. Mucosite Periimplantar e Periimplantite. In: Lindhe J., Niklaus P., Karring T. Editores. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5ª Edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 507-515, 2012

Binon PP. Evaluation of the effectiveness of a technique to prevent screw loosening. Journal Prosthetic Dentistry, 1998; 79(4):430-2, 1998.

Buchs AU, Hahn J, Vassos DM. Interim clinical study report: a threaded, hydroxylapatite-coat implant – five year restoration safety and efficacy. J. oral Impl., 1995. [s. i], v. 21, n. 4, p. 266-74,

Bottino MC, Tortamano IP, Valandro LF. Periimplantite: uma abordagem terapêutica.

J Bras Clin Odontol Integr 2005;9(48):66-72

Calcaterra R, Di Girolamo M, Mirisola C, Baggi L. Effects of Repeated Screw Tightening on Implant Abutment Interfaces in Terms of Bacterial and Yeast Leakage In Vitro: One-Time Abutment Versus Multiscrewing Technique. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2016; Volume 36, Number 2: 275-280.

Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J Periodontol*. 2005;76(1):115-20.

Coelho PG, Sudack P, Suzuki M, Kurtz KS, Romanos GE, Silva NR. In vitro evaluation of the implant abutment connection sealing capability of different implant systems. *Journal of Oral Rehabilitation*, 2008; 35(12):917-24

Covani U, Marconcini S, Crespi R, Baroni A. Bacterial plaque colonization around dental implant surface. *Implant dent*. Baltimore 2006;3(7).

Deconto MA, Salvoni AD, Wassall T. In vitro microbiological bacterial seal analysis of the implant/abutment connection in morse taper implants: a comparative study between 2 abutments. *Implant Dent*. 2010;19(2):158-66.

D'Ercole S, Scarano A, Perrotti V, Mulatinho J, Piattelli A, Iezzi G. Implants with internal hexagon and conical implant-abutment connections: an in vitro study of the bacterial contamination. *J Oral Implantol*. 2014 Feb;40(1):30-4.

D'Ercole S, Tripodi D, Ravera L, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G. Bacterial Leakage in Cone Internal Connection Implants Using Different Torque Values: An In Vitro Study. *Implant Dentistry*. 2014; Volume 23, Number 2: 175-179.

Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Sep-Oct;20(5):732-7

Ericsson IA, Persson LGA, Berglundh, T. Different types of inflammatory reactions in periimplant soft tissue. *J Clin Periodontol* 1995., v. 22, p. 255-261,

Faria R, May RG, Vasconcellos DK, Volpato CAM, Bottino MA. Evaluation of the bacterial leakage along the implant–abutment interface. *J Dent Implants*. 2011 Jul-Dec;1(2):51-7.

Faria KO, Silveira-Júnior CD, Silva-Neto JP, Mattos MGC, Silva MR, Neves FD. Comparison of methods to evaluate implant-abutment interface. *Brazilian Journal Oral Science*, 2013. Vol12. no.1

Figueredo CMS, Fisher RG. Aspectos microbiológicos da flora bacteriana em torno de implantes osteointegrados [texto na internet]. 2001 [citado 2012 ago 15]. Disponível em: <http://www.periodontiamedica.com.br/aspectos-microbiologicos-da-flora-bacteriana-em-torno-de-implantes-osteointegrados>.

Filho VM, Poubel LAC, Hidalgo R. Avaliação da taxa de sobrevida dos implantes dentários em estudos longitudinais com mais de 10 anos de acompanhamento: uma revisão sistemática de literatura. *Dental Press Implantology* . Oct-Dec 2014, Vol. 8 Issue 4, p28-34.

Finger IM, Castellon P, Block M, Elian N. The evolution of external and internal implant/abutment connections. *Practical Procedures and Aesthetic Dentistry Journal*, 2003; 15(8):626-32.

Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Impl Res*. 2007;18(4):501–8.

Gherlone EF, Capparé P, Pasciuta R, Grusovin MG, Mancini N, Burioni R. Evaluation of Resistance Against Bacterial Microleakage of a New Conical Implant-Abutment Connection Versus Conventional Connections: An In Vitro Study. *New Microbiologica*. 2016; 39: 49-56.

Gil FJ. Aflojamiento de tornillos de conexión implante dental-protesis mediante simulacion de cargas ciclicas masticatorias. *An. Mecánica la Fract*, 2003; 20(1):491-94.

Greenstein G, Cavallaro J, Tarnow D. Dental Implants in the Periodontal Patient. *Dental Clinics of North America*. 2010. v.54(1), p. 113-128.

Gross M, Abramovich I, Weiss EI. Microleakage at the abutment-implant interface of

osseointegrated implants: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(1):94-100.

Harder S, Dimaczek B, Ail Y, Terheyden H, Freitag-Wolf S, Kern M. Molecular leakage at implant-abutment connection- in vitro investigation of tightness of internal conical implant-abutment connections against endotoxin penetration. *Clinical Oral Investigation*, 2010; 14:427-32.

Harder S, Podschun R, Grancicova L, Mehl C, Kern M. Analysis of the Intraimplant Microflora of Two-Piece Dental Implants. *Clin Oral Invest*. 2013; 17: 1135-1142.

Hunt PR, Gartner JL, Norkin FJ. Choice of a dental implant system. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)*, 2005; 26(4):239-240.

Jansen, VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(4):527-40.

Kluk E, Reinhold FCBC, Pereira N, Mello AMD, Mello FAS. Uma abordagem sobre a clorexidina: ao antimicrobiana e modos de aplicação. *Revista Gesto & Saúde* 2016;v.14,n.1,p.7–13,

Koutouzis T, Gadalla H, Lundgren T. Bacterial Colonization of the Implant-Abutment Interface (IAI) of Dental Implants with a Sloped Marginal Design: An In Vitro Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2015; Volume*,Number*: 1-7.

Koutouzis T, Mesia R, Calderon N, Wong F,Wallet S. The Effect of Dynamic Loading on Bacterial Colonization of the Dental Implant Fixture-Abutment Interface: An In Vitro Study. *Journal of Oral Implantology*. 2014; Vol. XL/No. Four; :432-437.

Koutouzis T, Wallet S, Calderon N, Lundgren T. Bacterial colonization of the implant–abutment interface using an in vitro dynamic loading model. *J Periodontol*. 2011;82(4):613-8.

Lazzara RJ, Porter SS. Platform switching: a new concept in implant dentistry for controlling postrestorative crestal bone levels. *The Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26(1):9–17

Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008. v.35 (Suppl. 8): 282-285.

Liu Y, Wang J. Influences of microgap and micromotion of implant–abutment interface on marginal bone loss around implant neck. Archives of Oral Biology 2017; 83(11):153-60

Malo P, Nobre MA, Lopes A. The use of computer-guided flapless implant surgery and four implants placed in immediate function to support a fixed denture: preliminary results after a mean follow-up period of thirteen months. *J Prosthet Dent.* 2007 Jun; 97(6 Suppl):S26-34. Erratum in: *J Prosthet Dent.* 2008 Mar; 99(3):167.

Marchack CB. An immediately loaded CAD/CAM-guided definitive prosthesis: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 2005 Jan;93(1):8-12

Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Curr Opin Periodontol* 1997; 4:127-36.

Nascimento C, Barbosa RES, Issa JPM, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque RF. Bacterial leakage along the implant–abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(2):177–80.

Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Gonçalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, Macedo AP, de Albuquerque RF Jr. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012;27(3):551-60.

Nayak AG, Fernandes A, Kulkarni R, Ajantha GS, Lekha K, Nadiger R. Efficacy of Antibacterial Sealing Gel and O-Ring to Prevent Microleakage at the Implant Abutment Interface: An In Vitro Study. *Journal of Oral Implantology.* 2014; Vol.XL/No. One: 11-14.

Oliveira MC, Corrêa DFM, Lauredo LFB, Mendonça LPF, Lemos AB, Carmo GGW. Peri-implantite: etiologia e tratamento. *Revista Brasileira de Odontologia.* 2015; volume 72, n 1/2, 96-9.

Orsini G, Fanali S, Scarano A, Petrone G, di Silvestro S, Piattelli A. Tissue reactions, fluid, and bacterial infiltration in implants retrieved at autopsy: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000 Mar-Apr;15(2):283-6.

Padial-Molina M, Suarez F, Rios HF. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of

Peri-implant Diseases. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2014;34(6):e102-e111.

Peruzetto WM, Martinez EF, Peruzzo DC, Joly JC, Napimoga MH. Microbiological Seal of Two Types of Tapered Implants Connections. *Braz. Dent. J.* 2016; vol.27 no.3.

Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M, Assenza B, Leghissa GC, Di Bonaventura G, Catamo G, Piccolomini R. Fluids and Microbial Penetration in the Internal Part of Cemented-Retained Versus Screw-Retained Implant-Abutment Connections. *J Periodontol.* 2001; Volume 72- Number 9: 1146-1150.

Prado DSV. Avaliação do comportamento mecânico de prótese fixa implantossuportada com cantilever por meio da técnica de extensometria. elétrica (tese). Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2013.

Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5(4):239-44.

Quirynen M, van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res.* 1993;4(3):158-61.

Ribeiro RC, Ribeiro DG, Segalla JCM, Pinelli LAP, Silva RHBT. Próteses implantossuportadas parafusadas x cimentadas: qual a melhor escolha? *Salusvita.* 2008; 27(3): 371-382. 38

Resende CCD, Castro CG, Pereira LM, Prudente MS, Zancopé K, Davi LR, Penatti MPA, das Neves FD. Influence of the Prosthetic Index Into Morse Taper Implants on Bacterial Microleakage. *Implant Dentistry.* 2015; Volume 24, Number 5: 547-551.

Rodrigues MD. Manual de prótese sobre implantes. São Paulo: Artes Medicas; 2007. p. 31-66/83-112.

Sartori IAM, Sartori EM, Uhlendorf Y, Gurgel AC. Reabilitação de Maxilas com Implantes: Importância do Diagnóstico Protético Prévio. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2016;1:74-101.

Santos AMT. Biomechanical study of prosthetic interfaces: A literature review. *Dental Press Implantol.* 2013 Oct-Dec;7(4):90-7.

Silva-Neto JP, Prudente MS, Carneiro Tde A, Nóbilo MA, Penatti MP, Neves FD. Micro-leakage at the implant-abutment interface with different tightening torques in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(5):581-7.

Scarano A, Assenza B, Piattelli M, Iezzi G, Leghissa GC, Quaranta A, et al. A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments. *J Oral Implantol.* 2005;31(6):269-75.

Silva BCR, Carvalho PSP, Vedovato E, Bassi APR, Conforte JJ, Ponzoni D. Estudo retrospectivo da taxa de sobrevivência de implantes instalados por profissionais com diferentes graus de experiência na implantodontia. *RFO UPF* 2015; 20(30): 54-9

Stevão ELL. Implantes: hexágono externo e interno – uma breve revisão. *Rev ImplantNews* 2005; 2(6): 570-571.

Tagliari D, Takemoto M, Andrade MR. Tratamento da periimplantite: revisão de literatura. *Revista Científica Tecnológica.* 2015 v3 n2

Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(1):56–62.

Todescan FF, Pustiglioni FE, Imbronito AV, Albrektsson T, Gioso M. Influence of the microgap in the peri-implant hard and soft tissues: a histomorphometric study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(4):467-72.

Traversy MC, Birek C. Fluid and microbial leakage of implant-abutment assembly in vitro. *Journal Dental Research, Washington,* v.71, p.754, 1992.

Tripodi D, D'Ercole S, Iaculli F, Piattelli A, Iezzi G. Degree of Bacterial Microleakage at the Implant-Abutment Junction in Cone Morse Tapered Implants Under Loaded and Unloaded Conditions. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015; 13 (4):e367-e371.

Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, Walters KS. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol.* 1995;21(3):207-13.

Verdugo LC, Núñez JG, Avila AA, Larrucea SMC.. Microleakage of the prosthetic abutment/implant interface with internal and external connection: In vitro study. *Clinical*

Oral Implants Research, 2014; 25(9):1078-83.

Zupnik J, Kim SW, Ravens D, Karimbux N, Guze K. Factors associated with dental implant survival: a 4-year retrospective analysis. J Periodontol 2011; 82(10):1390-5.

