

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Doutorado em Odontologia

Rogério Nagai

**AVALIAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NA INTERFACE
PILAR IMPLANTE EM PACIENTES**

São Paulo

2023

Rogério Nagai

**AVALIAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NA INTERFACE
PILAR IMPLANTE EM PACIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro — UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia área de Concentração em Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo

2023

Ficha catalográfica

N138a Nagai, Rogério.
Avaliação dos antimicrobianos na interface pilar implante em
pacientes / Rogério Nagai. – 2023.
61 p. : il.
Orientador: Prof. Dr. Yeon Jung Kim.
Tese. (Doutorado em Odontologia) - Universidade Santo Amaro,
2023.
Bibliografia incluída.
1. Iodofórmio. 2. Espécies Reativas de Oxigênio. 3. Clorexidina. 4.
Péri-implante. 5. Próteses e Implantes I. Kim, Yeon Jung. II. Universidade
Santo Amaro. III. Título.

CDD 617.6

Rogério Nagai

**AVALIAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NA INTERFACE
PILAR IMPLANTE EM PACIENTES.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para defesa ao título de Doutor em Odontologia área de concentração em Implantodontia

Orientadora: Profa. Dra. Yeon Jung Kim

São Paulo, 04 de dezembro de 2023

Banca Examinadora

Profa. Dra. Yeon Jung Kim

Prof. Dr. Humberto Massaru Sonoda

Profa. Dra. Débora Pallos

Prof. Dr. Daniel Isaac Sendyk

Profa. Dra. Márcia Hiromi Tanaka

Conceito Final: _____

DEDICATÓRIA

DEDICO ESSE TRABALHO PRIMEIRAMENTE A QUEM ME DEU A VIDA DE ESTAR PRESENTE NESTE MOMENTO DEUS E MEUS PAIS, PRINCIPALMENTE AO MEU PAI HANEAKI NAGAI QUE APESAR DE NÃO ESTAR PRESENTE FISICAMENTE, SINTO SEMPRE A PRESENÇA DELE AO MEU LADO E A MINHA MÃE TEREZINHA YOKO NAGAI.

A MINHA ESPOSA CHRISTINA OKUBO NAGAI ETERNA COMPANHEIRA E INCENTIVADORA QUE SEMPRE ME INCENTIVA A BUSCAR CONHECIMENTOS E SEMPRE ME APOIA DANDO SUPORTE A NOSSA FAMÍLIA.

AOS MEUS FILHOS JULIANA OKUBO NAGAI E BRUNO OKUBO NAGAI POR SEREM MINHA FONTE DE INSPIRAÇÃO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar nessa trajetória e me colocar pessoas que me direcionassem por esse caminho.

Agradeço à Profa.Dra. Yeon Jung Kim, minha orientadora e incentivadora neste trabalho, sempre prestativa. Sou eternamente grato. Meu muito obrigado.

Agradeço à Profa Dra. Débora Pallos, muito prestativa neste projeto. Seu conhecimento vasto sobre o assunto que trabalhamos nos ajudou em muito para finalização deste projeto. Meu muito obrigado.

Agradeço a Profa.Dra Márcia Hiromi Tanaka, pela sua simplicidade com que faz o seu trabalho e carinho com os alunos. Meu muito obrigado.

Agradeço ao Prof,Dr. Humberto Massaru Sonoda por acreditar em meu potencial na época da graduação fez eu chegar aqui. Meu agradecimento eterno.

Ao Professor Dr. Wilson Roberto Sendyk, coordenador do programa de pós-graduação uma pessoa sábia e simples que tenta auxiliar a todos com o seu vasto conhecimento da área. Meu eterno obrigado.

Ao Prof.Dr Daniel Issac Sendyk por disponibilizar de seu tempo e seu conhecimento vasto na área para participar da banca de defesa do Doutorado. Meu muito obrigado.

Aos Professores do Doutorado em Implantodontia da UNISA. Muito obrigado por todos os ensinamentos.

Aos amigos que cruzaram em minha vida Alexandre Miyahira, Luiz Paulo Sacco e Pedro Carvalho Feitosa, obrigado pelo companheirismo.

Aos alunos da Iniciação Científica, Luiz Felipe Colpo, Karoline Cristine Mateus. Muito obrigado pela colaboração e ajuda.

Aos pacientes que participaram deste estudo, serei eternamente grato. Muito obrigado.

A Coordenação da Universidade Santo Amaro (Unisa) por nos proporcionar um ambiente e laboratórios para que realizasse este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) por meio do programa de Suporte à Pós-graduação de Instituições de Ensino Particular (PROSUP).

RESUMO

O uso de produtos antimicrobianos na interface pilar implante tem como principal função de controlar ou prevenir a infiltração microbiana na área, e pode ser considerada uma das principais causas e/ou progressão da periimplantite e possível perda do implante. Na literatura, há poucos estudos prévios sobre a infiltração microbiana na interface pilar e implante utilizando os antimicrobianos disponíveis no dia-dia da clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de antimicrobianos na infiltração bacteriana na interface pilar e implante em pacientes. Foram selecionados 16 pacientes e instalados 47 implantes cone morse (Titaniumfix®) divididos em 4 grupos: 1A – grupo controle; 2B – grupo Blue®M ;3C-grupo Clorexidina e 4D – grupo Proheal® e examinados em 4 tempos:T0-inserção dos implantes; T1-colocação dos cicatrizadores; T2- instalação da prótese; T3- controle após 1 mês da instalação da prótese. Foram coletados material de dentro dos implantes nestes tempos e analisados através da extração de DNA para ver a quantidade total de bactérias através do exame qPCR-RT. Os resultados na avaliação intra-grupo, em todo os grupos foram observados um aumento na quantidade totais de bactérias na interface pilar implante com o passar dos tempos. No grupo controle foi estatisticamente significativo no T2 ($p=0,0003$) e T3 ($p<0,0001$) comparado ao T0. Nos grupos Blue®M também ocorreu uma diferença estatisticamente significativa em T2(0,0011) e T3(0,00009)em relação a T0 e no grupo Clorexidina observou um diferença estatística significativa em T3 ($p=0,0011$) comparado ao T0. No grupo Proheal® a diferença estatística significativa foram observadas nos períodos T2 ($p=0,0448$) e T3 ($p=0,0032$) quando comparado ao T0.Na análise inter-grupo, comparação dos produtos em relação ao mesmo tempo experimental, não houve diferenças estatisticamente significantes. Concluiu-se clinicamente que os produtos antimicrobianos avaliados não diminuíram ou impediram a infiltração bacteriana na interface pilar e implante nos tempos experimentais.

Palavras-chave: Iodofórmio, Espécies Reativas de Oxigênio, Clorexidina, Peri-Implantite, Próteses e Implantes

ABSTRACT

The main function of the use of antimicrobial products at the implant abutment interface is to control or prevent microbial infiltration, as according to studies this would be one of the causes of peri-implantitis and subsequent loss of the implant. This study is justified by the fact that there is little clinical research in the literature on microbial infiltration at the abutment and implant interface using antimicrobials available in the clinic on a daily basis. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of antimicrobials in bacterial infiltration at the abutment and implant interface in patients. 16 patients were selected and 47 Titaniumfix® implants were installed, divided into 4 groups: 1A – control group; 2B – BlueM® group; 3C – Chlorhexidine group and 4D – Proheal® group and examined in 4 stages: T0 – insertion of implants; T1 – placement of healing pads; T2- installation of the prosthesis; T3- control after 1 month of prosthesis installation. Material was collected from inside the implants at these times and analyzed through DNA extraction to see the total amount of bacteria through the qPCR-RT exam. The results in the intra-group evaluation, in all groups, an increase in the total amount of bacteria at the implant abutment interface was observed over time. In the control group, it was statistically significant at T2 ($p=0.0003$) and T3 ($p<0.0001$) compared to T0. In the BlueM® groups there was also a statistically significant difference in T2 (0.0011) and T3 (0.00009) in relation to T0 and in the Chlorhexidine group there was a statistically significant difference in T3 ($p=0.0011$) compared to T0. In the Proheal® group, significant statistical differences were observed in periods T2 ($p=0.0448$) and T3 ($p=0.0032$) when compared to T0. In the inter-group analysis, comparison of products in relation to the same experimental time, there were no statistically significant differences. It was clinically concluded that the antimicrobial products evaluated did not reduce or prevent bacterial infiltration at the abutment and implant interface during the experimental times.

Key words: Iodoform, Reactive Oxygen Species, Chlorhexidine, Peri-Implantitis, Prostheses and Implants

Lista de Abreviaturas

IPI- interface pilar implante

P gingivalis – Porphyomonas gingivalis

E coli- Escherichia coli

microCT- microtomografia

N- Newtons

mm- milímetros

mm³- milímetros cúbicos

Ncm-Newtons por centímetro

HI-hexágono interno

MEV-microscopia eletrônica de varredura

H, IH- hexágono interno

C, CX, MT- cone morse

Hz- hertz

E faecalis- Enterococcus faecalis

CHX- clorexidina

qPCR-RT- reação de cadeia polimerase em tempo real

EH- hexágono externo

PH- Iodofórmio

gbpA- proteína A de ligação ao glucano

TCCB- tomografia computadorizada tipo cone beam

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma -Delineamento do estudo.....	27
Figura 2. Instalação do implante tempo T0 - (a) e (b) coleta da amostra com microaplicador estéril e com cone de papel estéril ;(c) inserção de produto de acordo com o grupo alocado - (d) armazenamento das amostras em microtubo identificado.....	29
Figura 3. Agulha sem bisel para inserção dos produtos.....	29
Figura 4. No período T1, cirurgia de reabertura do implante. (a)remoção do cover; (b) coleta da amostra com cone de papel estéril; (c)inserção do produto definido em T0; (d)colocação do cicatrizador no implante.....	30
Figura 5. Nas fases de moldagem e prova da próteses a) coleta da amostra com microaplicador estéril dentro do implante - (b) inserção do gel Blue®M, antes da recolocação do cicatrizador- (c) inserção de Clorexidina gel a 2%, antes da recolocação do cicatrizador - (d) recolocação de cicatrizador com o extravasamento do produto..	31
Figura 6. Tempo T3- controle após 1 mês da instalação da prótese :(a) prótese instalada; (b) remoção da prótese; (c) e (d) coleta da amostra com microaplicador estéril e cone de papel estéril; (e) e (f) antes e durante a colocação da pomada Proheal®; (g) pós a colocação da pomada Proheal®; (h) reinstalação da prótese com extravasamento da pomada.....	32
Figura 7. kit de extração de DNA PureLink® Genomic DNA Mini kit – Invitrogen® - conjunto de soluções para extração e purificação do DNA.....	33
Figura 8. Amostras coletadas descongelando à temperatura ambiente antes da extração do DNA.....	33
Figura 9. Agitador de soluções para misturar as amostras - Vórtex AP59 – Phoenix®.....	34
Figura 10. Proteinase K - Invitrogen® solução para realizar a lise das células da amostra.....	34
Figura 11. (a)Genomic Lysing/Binding Bufer (PureLink®) solução para realizar a lise dos microorganismos;(b) Miniestufa -Uniscience® aparelho que aquece para auxiliar na lise dos microorganismos.....	35
Figura 12. microcentrifuga D1008 DLAB Scientific Co., Ld. aparelho de misturar e homogenizar as amostras.....	36
Figura 13. (a) amostra com as solução de lise sendo transferida para filtragem- (b) solução com a amostra transferida na coluna de filtragem para purificação do DNA.....	36
Figura 14. Centrífuga MIKRO200R® – Hettich® Zentrifugen utilizada para centrifugação durante o processo de lavagem e purificação do DNA.....	37

Figura 15. Soluções para fazer a lavagem da amostra durante o processo de purificação do DNA. (a) Genomic Wash Buffer 1 e (b) Genomic Wash Buffer 2 -PureLink - Invitrogen®.....	37
Figura 16. (a)solução Genomic Elution Buffer - PureLink - Invitrogen® para a purificação do DNA;b) Acomodando microtubos para centrifugação final.....	38
Figura 17. Quantificação de DNA total da amostra (a) espectofotômetro Nano Drop One® - (Thermo Scientific)– (b) Depositando de 1ul de amostra para quantificação da leitura.....	39
Figura 18. (a)Termocicladora StepOne (Applied Biosystems, LifeTech, EUA utilizado; (b) software StepOne TM para leitura da reação em cadeia polimerase em tempo real.....	40

Lista de Tabelas, Gráficos e Anexos

Tabela 1 - Descrição de sequência de Primers Uni_16S para qPCR-RT	39
Tabela 2 - Quantificação totais de bactéria pelo qPCR-RT dos grupos nos períodos experimentais	41
Gráfico 1. Quantificação de bactérias totais pelos grupos com os períodos experimentais (tempos).....	42
Gráfico 2. Quantificação de bactérias totais no grupo controle nos tempos T0, T1, T2, T3.....	43
Gráfico 3. Quantificação de bactérias totais no grupo Blue®M nos tempos T0, T1, T2, T3.....	43
Gráfico 4. Quantificação de bactérias totais no grupo Clorexidina (3C) nos tempos T0, T1, T2, T3.....	44
Gráfico 5. Quantificação de bactérias totais no grupo Proheal®(4D) nos tempos T0, T1, T2, T3.....	45
Gráfico 6. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T0.....	45
Gráfico 7. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T1.....	46
Gráfico 8. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T2.....	47
Gráfico 9. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T3.....	47
Anexo 1- parecer consubstanciado do CEP- Plataforma Brasil.....	59
Anexo 2- TCLE.....	60

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Microgap na interface pilar implante.....	14
2.2. Antimicrobianos utilizados na interface pilar implante.....	17
3.OBJETIVO.....	25
3.1. Objetivo específico.....	25
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	26
4.2. Planejamento Clínico.....	26
4.3. Cirurgia de instalação de implantes.....	28
4.4. Etapa Laboratorial.....	33
4.4.1. Extração de DNA.....	33
4.4.2. Quantificação e qualificação das Amostras de DNA.....	38
4.4.3. Detecção e Quantificação das bactérias totais pela Reação em Cadeia Polimerase em Tempo real (qPCR-RT)	39
4.4.4. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Caracterização da população estudada.....	42
5.2. Detecção e Quantificação de bactérias totais.....	42
6.DISSCUSSÃO.....	49
7.CONCLUSÃO.....	53
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS	

1.Introdução

As reabilitações orais com o uso de implantes osseointegrados na implantodontia atual, apresentam resultados previsíveis e estáveis ao longo prazo, com uma alta taxa de sucesso e sobrevivência, em torno de 90 a 98%(Pita et al ,2017; Mishra et al.,2017; Fernandes et al.,2023). Apesar das altas taxas de sucesso, podem ocorrer falhas dos implantes, levando a fracassos do tratamento reabilitador. E diante dessas situações o implantodontista deverá estar preparado a elucidar seu paciente sobre a probabilidade de fracasso, eventuais complicações e métodos que permitem minimizá-lo.

Dentre as falhas dos implantes, a peri-implantite é a principal complicação relacionada. A doença peri-implantar consiste em uma condição infecciosa e inflamatória que acomete os tecidos ósseos e gengivais ao redor dos implantes. A formação de biofilme bacteriano na superfície do implante é evento fundamental das infecções peri-implantares, podendo até levar perda do implante dentário (Pita et al.,2017; Caricasulo et al.,2018; Vinhas et al.,2020;Machtei et al.,2021). Entre as hipóteses de estabelecimento da peri-implantite, acredita-se que a colonização na interface implante e pilar protético, devido a presença de microgaps e conseqüentemente a formação progressiva de biofilme bacteriano na superfície do implante, seja a principal (Carcuac et al.,2015; Garrana et al.2016; Lauritano et al.,2020; Mattei et al.2021).

As dimensões dos microgaps estão diretamente relacionadas com uma maior infiltração e/ou fluxo de resíduos e bactérias que venham a colonizar essa região. O aumento do tamanho dos microgaps podem ser influenciadas por diversos fatores como falta de adaptação entre implantes e componentes protéticos, diminuição dos torques de apertamento dos parafusos ou componentes, micromovimentações e deformações plásticas dos componentes durante os ciclos mastigatórios (Smith eTurkyilmaz,2014; Canullo et al.,2015; Li et al.,2019; Velez et al.,2020; Matsuoka et al.,2021; Gehrke et al.,2022; Yu et al.,2022).

Na literatura atual, ainda não há relato de sistemas de conexão de implantes com uma vedação completa da interface implante e pilar protético. Embora o sistema

de conexão cone morse seja considerado o mais estável com menor microgap, variando entre 10 a 135 μ m, ainda apresenta infiltração de microrganismos, mesmo que em menor quantidade quando comparado a conexões de hexágono externo e/ou interno (Mishra et al.,2017; Sinjari et al.,2018; Ferrari Jr et al.,2022).

Frente a este desafio, vários pesquisadores procuram soluções que auxiliem na prevenção ou controle bacteriano nesta região com a utilização de produtos contendo substâncias antimicrobianas como clorexidina, reativos de oxigênio, iodofórmio (Cruz,2002; Cunha et al.,2019; Han,2019; Ferrari Jr et al.,2022).

Atualmente a clorexidina é um antisséptico padrão-ouro para controle bacteriano do biofilme oral, de amplo espectro tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, capaz de inibir a formação de placa bacteriana mesmo em baixas concentrações (Haydari et al.,2017; D'Ercole et al. 2020; Machtei et al.,2021). Entretanto pesquisas prévias demonstraram efeitos adversos como alteração do paladar do paciente, manchamentos de restaurações e citotoxicidade celular (Sinjari et al.,2018; Fiorillo,2019; Alshahaf et al.,2023).

O Blue®M é um antimicrobiano de amplo espectro que usa como base o oxigênio ativo, recentemente introduzido no mercado odontológico, com poucos estudos (Dryden,2018; Santos et al.,2023). Já o Proheal® é uma pomada a base de iodofórmio, muito utilizado na endodontia pela sua ação bacteriostático e bactericida (Cruz,2002; Cruz et al.2011).

Apesar desses produtos serem já utilizados na Implantodontia com essa finalidade, a maioria das evidências científicas são provenientes dos estudos em modelo in vitro, com a dificuldade de transladar os resultados para clínica diária.

Portanto, a realização deste estudo se justifica pelo fato de haver poucas pesquisas clínicas na literatura sobre a infiltração microbiana na interface pilar e implante utilizando os antimicrobianos disponíveis na prática diária da clínica, com o intuito de diminuir ou até mesmo impedir essa infiltração, pois os resultados podem contribuir para a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares a longo prazo.

2.Revisão da Literatura

2.1. Microgap na interface pilar implante

Com o intuito de avaliar o microgap existente na interface pilar implante vários autores como Rismanchian et al. (2012) avaliaram o tamanho dos microgaps e a infiltração bacteriana de diferentes conexões de implantes marca Straumann®. Utilizaram 36 implantes e 4 tipos de pilares (2 sólidos e 2 fundido). Primeiramente realizaram a introdução de microrganismo (*Escherichia coli*) na parede interna dos implantes e depois colocaram os pilares com torque de 35N. Imergiram cada implante com seu pilar numa solução de cultura dentro de um microtubo. A análise do microgap foi através de microscopia eletrônica de varredura. Analisaram o vazamento bacteriano que poderia ocorrer nestes tipos de conexões através da inoculação de microrganismos dentro do implante. Concluíram que independentemente do tipo de pilar, não tiveram redução significativa no tamanho microgap e todos eles não apresentaram redução na infiltração bacteriana.

Num estudo transversal após 5 anos de carga funcional, Cannulo et al. (2015), avaliaram a flora bacteriana presente nas conexões pilar implante de 40 pacientes. As análises microbiológicas foram realizadas nas regiões dos sulcos periimplantares, interior das conexões e superfícies dos pilares. Foram divididos em 4 grupos: controle (hexágono externo); teste 1(hexágono interno com colar duplo); teste 2 (hexágono interno com colar externo) e teste 3 (cone morse) Estas análises foram realizadas com qPCR em tempo real para bactérias totais e 10 tipos de bactérias. Concluíram que após 5 anos todas as áreas observadas estavam contaminadas com os microrganismos, principalmente dentro das conexões dos implantes.

Já Scarano et al. (2016) avaliaram os microgaps e espaços internos dos implantes através da microtomografia tridimensional de raio X, onde eles observaram as superfícies de contato pilar implante, microgaps e o volume interno em diferentes implantes. Utilizaram para este estudo 40 implantes, divididos em 4 grupos sendo 10 para cada grupo: o grupo 1:hexágono interno aparafusado(Universal II HI Implacil de Bortoli), o grupo 2:cone morse(Universal II cone morse = Implacil de Bortoli), grupo 3: cone morse(Ankylos plus-Dentisply), grupo 4: trilobular aparafusado(Nobel

Biocare).As imagens adquiridas foram analisadas em um modelo 3D. No grupo 1 apresentaram vários espaços na interface pilar parafuso, nos outros grupos não se observaram espaços ou separação entre na conexão interna pilar implante. O volume interno foi maior no grupo1(9304mm³) e menor no grupo 2(5014mm³). Os autores concluíram que a microtomografia é um método eficaz para análise das superfícies das conexões dos implantes.

Outra forma de avaliar o microgap foi realizado por Black et al. (2017) num trabalho in vitro para medir a capacidade de vedação dos implantes cone morse na interface pilar-implante sob diferentes valores de torque do parafuso do pilar usando pilares de titânio e zircônia. Utilizaram 42 implantes sendo 21 pilares de titânio e 21 pilares de zircônia, divididos em 4 grupos(n=10) com torques de 20 e 35 Ncm e controle com torque de 10Ncm. A microinfiltração foi quantificada pela contagem das bactérias das unidades formadoras de colônias. Os resultados deste estudo não indicaram diferença estatisticamente significativa na capacidade de vedação entre os pilares de titânio e zircônia, com conexões cônicas internas, após o aumento do torque do parafuso do pilar. Concluindo que a capacidade de vedação não muda com o torque.

Dias et al. (2018) avaliaram também os microgap nos implantes cone morse na conexão pilar e o implante, e analisaram o vazamento bacteriano em quatro sistemas de implantes (Neodent, Ankylos,,Nobel Biocare, Conexão) de conexão cônica. Para verificar o vazamento bacteriano foram inoculados microorganismo (*Escherichia coli*) dentro da parte interna dos implantes. As amostras foram cortadas longitudinalmente para analisar o exame microbiológico e o microgap foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e a microtomografia foi utilizada para avaliar a circularidade da plataforma do implante para validar qualitativamente os achados microscópicos. Os autores concluíram que todos os implantes tiveram vazamento bacteriano e pela microtomografia mostrava falha no seu contorno na conexão entre o pilar e implante.

Bagegni et al. (2021) avaliaram o efeito da carga cíclica dinâmica in vitro no microgap da interface pilar implante com diferentes alturas de pilar. Foram utilizados 48 implantes divididos em 2 grupos: 24 hexagono interno(H) e 24 cone morse(C). E ainda subdivididos em 3 grupos cada: Ficando assim H1, C1 -10mm; H2 , C2-14mm e H3,C3 – 18mm. Todos foram submetidos a carga cíclica em um simulador de

mastigação. Os microgaps foram inspecionados antes e após a carga cíclica, utilizando uma microtomografia computadorizada e microscopia óptica. Os resultados mostraram que os pilares sofreram intrusão diminuindo os espaços. Os autores concluíram que independente da altura todos os pilares após a carga cíclica diminuem o microgap.

Em 2022, Greco & Napimoga realizaram um trabalho in vitro para investigar a capacidade de selamento e a infiltração bacteriana dos implantes cone morse da marca Plenum® com plataforma regular e slim. Utilizaram 38 implantes, onde 14 desses implantes foram inseridos os microrganismos (*Escherichia coli*) dentro do implante e instalados os pilares. Os outros 24 foram colocados os pilares de acordo com o fabricante e depois colocados em um meio de cultura com os mesmos microrganismos a 37°C por 14 dias. Concluíram que os implantes da marca Plenum® obtiveram um selamento e impedimento infiltração bacteriana total, onde não houve o extravasamento bacteriano dos microrganismos que estavam dentro do implante e os implantes que foram mergulhados não tiveram contaminação interna.

Fernandes et al. (2023) avaliaram o microgap e a microinfiltração bacteriana analisando as interfaces implante-parafuso de cobertura e implante-pilar de cicatrização e avaliaram também a resposta biológica na interface de um agente selante à base de silicone. As interfaces dos microgaps foram analisados com microscopia eletrônica de varredura e a microinfiltração bacteriana foi avaliada após colonização com *Enterococcus faecalis* em acompanhamento de 30 dias. Concluíram que a interface implante-pilar de cicatrização e implante-parafuso de cobertura do sistema testado, apesar do baixo microgap, permitiram microinfiltração bacteriana após colonização interna. O uso de um agente selante não irritante à base de silicone não selou efetivamente o sistema.

Avaliando o aparecimento de microgaps , a infiltração bacteriana , a perda de torque do parafuso que poderiam favorecer e as deformações , Simionato et al. (2023) verificaram in vitro duas conexões cônicas internas com angulação de 11,5°(Alvim) e 16°(Grand Morse-Neodent/ Straumann) com a conexão hexagonal externa (Titamax-Neodent/ Straumann) como comparativo após ciclagem termomecânica utilizando saliva como contaminante. Para análise da perda de torque, deformação e o deslocamento utilizaram o microCT e microscopia eletrônica de varredura

(MEV). Concluíram que todos os grupos apresentaram contaminação e que o ambiente na interface pode favorecer o desenvolvimento e o crescimento bacteriano e ainda não houve deformação na interface pilar implante após a ciclagem termomecânica.

2.2. Antimicrobianos utilizados na interface pilar implante.

Diante do problema da colonização do microgap na interface pilar e implante, diversos produtos contendo substâncias antimicrobianas têm sido utilizados na Implantodontia na tentativa de prevenir e/ou reduzir a contaminação. Dentre os produtos antimicrobianos utilizados na implantodontia, a clorexidina é o antisséptico considerado como o padrão ouro (Jones, 1997; Haydari et al., 2017), é um composto sintético da família da bisguanida, que tem uma ação bacteriostática e bactericida de amplo espectro que age tanto em bactérias Gram positivas como em Gram negativos, fungos e alguns vírus lipofílicos. Por outro lado, tem apresentado alguns efeitos colaterais dependendo do uso e da dosagem como manchamento, alterações nas sensações gustativas, dor na mucosa oral, língua e/ou gengiva, sensação de secura, descoloração, perda de paladar e sensação de dormência Além de efeitos citotóxicos sobre as células fibroblástica (Alsaahaf et al., 2023).

Recentemente foi lançado no mercado odontológico, o Blue®M (Bluem Europe BV, Zwolle, Overijssel, Holland) que tem o princípio ativo a base de oxigênio. Estudos de caso clínicos com Blue®M relataram um alto poder bactericida e cicatrizante nos processos infecciosos e cirúrgicos. A sua composição contém perborato de sódio, salicilato de metila, a enzima glicose oxidase derivada do mel, xilitol e lactoferrina (Mattei et al., 2021). As aplicações em odontologia variam desde o uso em pós-operatório de cirurgias oral menor, em úlceras bucais, periodontites, peri-implantite e irrigação de canais radiculares durante a endodontia, segundo o fabricante.

Outro produto comercializado no mercado nacional com a finalidade de vedação da interface pilar implante é o Proheal®, uma pomada a base de iodofórmio, óleo de calêndula e lanolina. Na endodontia, o iodofórmio é aplicado na

descontaminação dos canais radiculares, por apresentar uma ação desinfectante e detergente por sua capacidade de oxidação e do poder redutor do iodo sobre as secreções bacterianas (Cerqueira et al., 2008). O Proheal® é um agente cimentante de preenchimento com ação antisséptica indicada na prevenção e redução contaminação microbiana do interior dos implantes dentários, componentes cirúrgicos, protéticos e próteses temporárias e definitivas implanto-suportadas. Indicado também para o controle microbiano exercendo ação antiaderente de biofilme nas superfícies de fios de sutura, dentes temporários de resina acrílica, superfícies de dentes naturais sob mock-ups e superfícies de dispositivos utilizados na cavidade oral, como cimento cirúrgico, epíteses entre outros, segundo o fabricante.

Diante disso, a revisão a seguir tem a finalidade de apresentar pesquisas com produtos comumente utilizados na Implantodontia para solucionar ou minimizar o problema de contaminação bacteriana da interface pilar e implante

Cruz em 2002 avaliou a eficiência da pomada de iodofórmio (Proheal®) ao longo de 5 anos. Através de um ensaio clínico, cego, randomizado e boca dividida foram avaliados um grupo de 50 pacientes de ambos os sexos, com idade entre 25 e 80 anos que haviam realizados cirurgias de implantes e sendo acompanhados 12, 18, 24, 30, 36 e 60 meses. Cada paciente teve pelo menos dois implantes colocados: um sem a pomada, que atuou como grupo controle e o outro, que atuou como grupo teste, com a pomada aplicada no parafuso de cobertura. Ao todo, 176 implantes foram analisados, n=79 do grupo controle e n=97 do grupo teste. Os investigadores procuraram sintomas clínicos como inflamação, fístula, mau cheiro e perda do parafuso de cobertura. Também foi observada a qualidade organoléptica das propriedades da pomada e testaram sua atividade antisséptica usando uma cultura bacteriana. Obtiveram os seguintes resultados no grupo teste: os sintomas estavam ausentes em todos os implantes, enquanto no grupo controle apresentaram os sinais/sintomas de colonização bacteriana, como: mau cheiro em 47 implantes; 20 implantes com eritema claro ao redor da plataforma; 07 implantes com parafusos frouxos, sendo que destes quatro com exposição do cover-screw e um sem tampa e 14 com fístula. Além destes, 11 implantes tiveram tecido inflamatório ao redor do parafuso de cobertura, sem sinal externo de inflamação mostrado após a sua exposição. Dentre esses implantes 4 não apresentaram mau cheiro. O número total

de implantes com sinais/sintomas de colonização bacteriana no grupo de controle foram de 52. As propriedades organolépticas da pomada foram reduzidas após três anos, mas permaneceu presente, assim como sua atividade antisséptica. O autor conclui que a pomada foi eficaz no controlar a contaminação bacteriana do ambiente interno dos implantes durante o período osseointegração e permaneceu em vigor por um período de cinco anos. As propriedades organolépticas diminuíram após três anos, mas a atividade antisséptica foi mantida durante todo o período de estudo de cinco anos.

Após alguns anos em 2011, Cruz et al. realizaram uma revisão da literatura dos dispositivos ou medicamentos utilizados até o presente momento visando controlar a contaminação bacteriana. Estudos elegíveis foram identificados entre 1991 e 2011 nas bases de dados eletrônicas: PubMed, EMBASE, OVID, Cochrane Lybrary. Em adição, foram pesquisados diretamente os seguintes periódicos: International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, Journal of Clinical Periodontology, Journal of Prosthetic Dentistry e Journal of Periodontology. Também foram no Google (www.google.com), e utilizaram como palavras chaves implantes dentários, mucosite, peri-implantite, fendas, contaminação microbiana/bacteriana, cone morse, anel de silicone, implantes não submersos, timol, sílica, polisiloxano, iodofórmio, lanolina, calêndula, cera de abelha, nipazol e propilparabeno. Os autores concluíram que existem várias formas de controlar a contaminação bacteriana nas conexões dos implantes. A contaminação ocorre apesar dos esforços para eliminá-la. No entanto, conexão cone morse, o anel de vedação, o cimento fosfato de zinco e a pomada Proheal® demonstraram capacidade de reduzir esta contaminação. A pomada Proheal® se destacou novamente por obter um melhor desempenho.

Já Ozdiler et al. (2018) compararam a infiltração bacteriana de implantes de conexão interna cônica com diferentes ângulos de conicidade (5,4; 12; 45 e 60 graus) e em seguida analisaram a eficiência de um agente desinfetante e um agente selante de silicone na prevenção. Usaram 21 conexões pilar implante de 4 sistemas ((Ankylos Implants, Dentsply; Bego Semados S Implants, Bego; Trias Implants, Servo-Dental; DTI Implants, DTI) total de 84 implantes. Foram divididos em 3 grupos de cada sistema de implantes. O primeiro grupo controle sem produto, segundo grupo selado com gel de clorexidina 2% e o terceiro grupo selado com silicone (Kieroseal). O torque de

inserção dos pilares foi de acordo com a recomendação do fabricante. Cada grupo foi parcialmente submerso numa suspensão de microrganismo (*E faecalis*) e submetidos a uma carga cíclica de 50N a 2mm do centro da coroa com total de 500.000 ciclos a 1Hz. O carregamento dinâmico foi realizado por 4 dias. Após isso foram desconectados os pilares dos implantes, coletadas as amostras das roscas internas dos implantes e analisadas. Concluíram que o gel de clorexidina e o selante de silicone podem reduzir o fluxo bacteriano.

Han (2019) avaliou in vitro a eficácia do gel Blue®M na interface pilar-implante em três tipos de conexões: hexágono externo, hexágono interno e cone morse da marca Dentoflex®. Utilizou 45 implantes, 15 em cada conexão. Foram divididos em 3 grupos: controle sem produto, gel de Blue®M, gel de clorexidina a 2%, os produtos foram inseridos no interior do implante e colocados os pilares com torque de 35N de acordo com o fabricante. Após isso foram colocados num tubo com a cultura de *Porphyromonas gingivalis* por 4 dias a 37°C. A análise foi por qPCR-RT. Concluiu que o gel de Blue®M é eficaz na diminuição da infiltração bacteriana por *P. gingivalis* comparável a clorexidina gel a 2%.

Em um estudo in vitro, Nascimento et al. (2019) avaliaram a eficácia de uma pasta de iodofórmio e pilares revestidos de prata na prevenção da colonização microbiana e o vazamento através da interface implante-pilar de implantes cone morse e hexágono interno. Setenta e dois implantes sendo que 36 cone morse (n = 36) e 36 hexágono interno (n = 36) foram divididos em 3 grupos cada tipo de implantes na qual foram tratados com pasta de iodofórmio (n = 12), pilares revestidos com prata (n = 12) ou controle (n = 12). Os resultados obtidos demonstraram que a contaminação fora reduzida nos implantes submetidos aos tratamentos antimicrobianos e as contagens microbianas mais baixas foram registradas para implantes cone morse com pilares revestidos de prata apesar do tempo de incubação ser somente por 7 dias. Concluíram que a colonização microbiana foi reduzida em ambas as conexões (cone morse e hexágono interno) submetidas aos tratamentos antimicrobianos apesar dos tratamentos não serem seletivos na redução das espécies microbianas alvo.

De outra forma fazendo um estudo clínico em humanos, D'Ercole et al. (2020) analisaram no pilar de cicatrização e ao redor nos tecidos moles peri-implantares a presença *Porphyromonas gingivalis*. Foram realizados experimentos com trinta

pacientes (15 em cada grupo) para verificar o efeito da clorexidina 0,20% (CHX) versus placebo, aplicada em cada etapa da reabilitação. Após foi coletado e quantificada por Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) no parafuso de cicatrização o que se tinha aderido de *Porphyromonas gingivalis*. Realizaram também uma análise imuno-histoquímica da biópsia gengival retirada na colocação do pilar cicatrizador. Os resultados mostraram uma baixa presença significativa de carga de *Porphyromonas gingivalis* nos pilares de cicatrização pertencentes ao grupo CHX 0,20%. No geral, as diferenças em termos de número de cópias de DNA de *Porphyromonas gingivalis* entre os dois grupos foram estatisticamente significativas ($p < 0,01$). Todos os implantes apresentaram pontuações de placa e nível de sangramento baixo, mas o grupo placebo pareceu ter a expressão mais alta de marcadores de inflamação. Concluíram que o uso de CHX a 0,20% pode ser recomendado em todos os procedimentos clínicos, pois reduz significativamente a carga de *Porphyromonas gingivalis* e a resposta inflamatória do hospedeiro ao redor dos implantes.

Niveda e Kaarthikeyan em 2020 compararam o efeito do gel oral com oxigênio ativo (Blue®M) e do gel de clorexidina no tratamento da periodontite, avaliando e comparando as alterações nos parâmetros clínicos, como profundidade da bolsa de sondagem, sangramento à sondagem, níveis de inserção clínica. Foi realizado ensaio clínico randomizado de boca dividida com 10 pacientes que sofriam de periodontite moderada a grave. Todos receberam raspagem supra e subgengival e orientação sobre higiene bucal. Após duas semanas foram aplicados aleatoriamente os produtos Blue®M e gel de clorexidina Hexigel®, além dos procedimentos já relatados. Nesta segunda visita foram considerados os valores iniciais de todos os parâmetros avaliados no estudo. O paciente foi chamado para reaplicação e foi reavaliado quanto aos parâmetros clínicos após 3 semanas e 6 semanas. A profundidade média de sondagem no dia inicial para o grupo Blue®M gel foi de 7,2 mm $SD \pm 0,42$ mm e a profundidade média de sondagem seis semanas após a raspagem inicial e aplicação do medicamento foi de 4,7 $SD \pm 0,57$ mm com um valor p significativo (0,042). A profundidade média de sondagem no dia da administração do fármaco no grupo Hexigel® gel foi de 7,0 mm $SD \pm 0,57$ mm e a profundidade média de sondagem seis semanas após a administração do fármaco foi de 5,7 $SD \pm 0,64$ mm. Os resultados, percebe-se que há uma diferença significativa na redução da profundidade da bolsa

de sondagem. O grupo Blue®M apresentou melhor potencial na redução da profundidade de sondagem. Conclui que a oxigenoterapia tópica é tão eficaz como a clorexidina na redução das bolsas periodontais em conjunto com os procedimentos básicos.

Ferrari Jr et al. (2021) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma pasta à base de iodofórmio e a clorexidina aplicada na superfície de três tipos de conexão implante pilar. Foram utilizados 45 implantes dentários na qual 15 eram cone morse (MT), 15 hexágono interno (IH) e 15 hexágono externo(EH) e 5 implantes de cada grupo foram distribuídos em 3 grupos de acordo com o material antimicrobiano. O primeiro grupo foi o de controle (GC), o segundo com clorexidina (CX) e o terceiro foi a pasta de iodofórmio (PH). Os produtos foram adicionados internamente em cada implante de seu grupo e em seguida os pilares foram adaptados e torqueados de acordo com o fabricante e submergidos em uma solução com *Porphyomonas gingivalis* durante 5 dias. Após foi feita a extração do DNA de cada implante e quantificado usando qPCR. Todas as conexões sofreram contaminações por *Porphyomonas gingivalis*. Concluíram que a conexão cone morse foi menos suscetível à contaminação bacteriana. O iodofórmio e a clorexidina são eficazes no controle do crescimento de *Porphyomonas gingivalis* nas conexões testadas em comparação ao grupo controle.

Yu et al. (2022) avaliaram o uso de agente de vedação de silicone na microinfiltração na interface pilar implante, perda do torque do parafuso e desgaste da rosca com carga cíclica em 3 sistemas de implantes em um trabalho in vitro. Utilizando 30 implantes divididos e separados em 2 grupos que seria selado e não selado. Usaram 5 implantes para cada um dos 3 sistemas de implantes (Nobel®, Straumann® e WEGO®) e em cada grupo. Uma solução de azul de toluidina foi injetada dentro do implante para avaliar microinfiltração na interface do pilar do implante antes de apertar. Depois de apertar com o torque recomendado a 20N e um força dinâmica de 200 N em um eixo de 30 graus foi aplicado a 2 Hz por 48 horas. O parafuso do pilar as morfologias foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram que todos os implantes que utilizaram o gel de silicone diminuíram a microinfiltração após a carga cíclica e também reduziu a perda de torque.

Fernandes et al. (2022) realizaram um estudo in vitro para avaliar o microgap e a microinfiltração bacteriana de um sistema de implante tipo conexão híbrida aparafusados com diferentes tipos de torque, o recomendado pelo fabricante 25N e um reduzido 5N com e sem agente selante de silicone (Gapseal). Foram utilizados 20 implantes de 4.,0x11mm da marca- KLOCKNER Vega®, Barcelona, Espanha) e pilares retos de titânio (comprimento total de 8 mm - KLOCKNER®, Barcelona, Espanha). O microgap foi determinado por microscopia eletrônica de varredura e a microinfiltração bacteriana foi avaliada in vitro, após a colonização do sistema por *Enterococcus faecalis* durante um período de 30 dias. Foram constatados a microinfiltração bacteriana tanto com 25 N e 5N. Com a aplicação de um selador à base de silício (Gapseal) obteve uma capacidade de vedação tanto no torque recomendado pelo fabricante como com baixo torque. Concluíram que a utilização de um agente de vedação à base de silicone pode auxiliar na manutenção da eficácia da vedação mesmo em condições de baixo torque.

Smöjver et al. (2022) avaliaram a capacidade de selamento e a eficácia antimicrobiana com diferentes materiais projetados para selar o microgap e seu comportamento em diferentes tipos de conexão pilar implantes internos cônicos e retos. Cem implantes dentários com pilares protéticos originais foram divididos em dois grupos de cinquenta implantes de acordo com o tipo de conexão pilar implante. Três materiais de vedação diferentes: GapSeal®(Hager e Werken , Duisburg, Alemanha) é um material de vedação à base de silicone viscoso com timol, Flow.sil®(Bredent GmbH e Co.KG, Senden , Alemanha) é um selante baseado em polidimetilsiloxano com o adição de timol) e gel Oxysafe® (Hager e Werken , Duisburg, Alemanha), que é um material que tem oxigênio ativo usado no tratamento de periodontite e peri-implantite foram aplicados nos subgrupos de teste e dois controles um com clorexidina e outro sem produto nenhum. A contaminação dos conjuntos implante-pilar foi realizada por uma suspensão contendo *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* por 14 dias. Concluíram que o tipo de conexão pilar implante não teve influência na microinfiltração em relação à infecção microbiana. Nenhum dos agentes de vedação vedou totalmente contra a microinfiltração.

Com o intuito de avaliar in vitro o colutório Blue®M que tem o oxigênio ativo em sua composição em 2023, Santos et al. analisaram a capacidade antimicrobiana,

efeito citotóxico sobre as células fibroblásticas do colutório e sua influência na expressão do gene *gbpA* contra a bactéria *Streptococcus mutans*. Foram divididos em grupo sem produto, grupo com clorexidina a 0,12% como controle e o Blue®M foi diluído 12,5%, 25% e 50%. Na análise da microscopia confocal a laser revelaram efeito significativo do Blue®M no biofilme de *S. mutans* pré-formado nas superfícies dentinárias a partir da concentração de 25% e mais efetivamente com 50% e com 12,5% não teve efeito. No caso da análise da expressão do gene *gbpA* indicou uma diminuição na expressão do gene após 15 min de tratamento com Blue®M na concentração de 25%. Além disso, Blue®M exibiu baixos níveis de citotoxicidade sobre as células. Concluíram que o Blue®M é um produto que pode fazer o controle do biofilme, pois tem uma eficácia antimicrobiana, baixa toxicidade e consegue modular o gene *gbpA* do *Streptococcus mutans*.

3.Objetivo

Avaliar a ação antimicrobiana do gel Blue®M, gel de clorexidina a 2% e da pomada Proheal® na infiltração bacteriana da interface implante e pilar protético em pacientes.

3.1. Objetivo específico

Detectar e quantificar o total das bactérias da interface implante e pilar protético após inserção do gel Blue®M, gel de clorexidina 2% ou a pomada de Proheal® em pacientes, por método de reação em cadeia da polimerase em tempo real(qPCR-RT), desde o momento de instalação(T0), colocação do cicatrizador (T1), instalação da prótese (T2) e após 30 dias da instalação da prótese definitiva(T3).

4.MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Santo Amaro - São Paulo - Brasil (Plataforma Brasil -CAEE 57816422.4.0000.0081) (Anexo 1)

Foram instalados 47 implantes em 16 pacientes selecionados que procuraram atendimento reabilitador com implantes dentários na clínica do Curso de Especialização - SCpós Cursos – na cidade de Osasco – SP. Todos os pacientes selecionados foram informados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (Anexo 2)

4.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos os pacientes maiores de 18 anos, de ambos os gêneros, com condições sistêmicas ASA I: Saudável, não fumante, nenhum ou uso mínimo de álcool, ou ASA II: Apenas doenças leves, sem limitações funcionais significativas, de acordo com American Society of Anesthesiologists(Doyle et al.,2023) sendo sem comorbidades impeditivas à cirurgia e com possibilidade de implantação imediata de implantes.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram comorbidades, como diabéticos e hipertensos descompensados, câncer, imunodeprimidos, em uso de antirreabsortivos ósseos, em quimioterapia, grávidas ou lactantes, pacientes com doenças periodontais avançadas e aqueles que tinham necessidade de procedimentos de reconstrução óssea previamente a instalação de implantes.

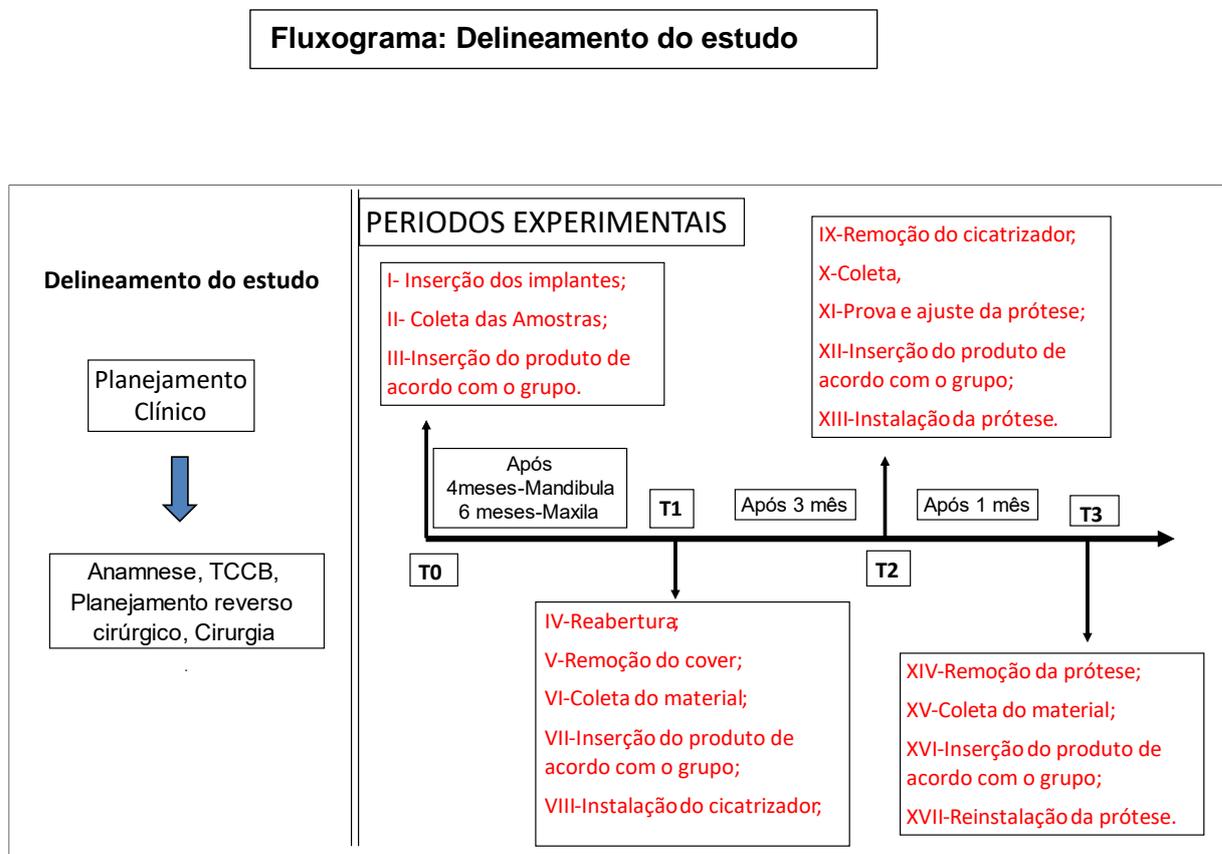
4.2. Planejamento clínico

Inicialmente todos os pacientes foram submetidos a anamnese e exame clínico intraoral para verificar a necessidade de reabilitação com próteses sobre implantes dentários. No exame clínico, verificou-se a região desdentada para reabilitação protética com implantes dentários, analisando o espaço oclusal, higiene oral, e

condições de saúde dos elementos dentais presentes. Em seguida, foi solicitado exames de Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB) com cortes de 2mm e exames de sangue laboratoriais de rotina.

O planejamento dos casos clínicos, reuniram informações dos exames clínicos, TCCB, exames laboratoriais, fotos intra e extra-orais e encerramento diagnóstico, que possibilitaram determinar as dimensões e o melhor posicionamento tridimensional dos implantes.

Os períodos experimentais avaliados consistiram em quatro tempos clínicos, sendo T0 - cirurgia para instalação dos implantes, T1 – reabertura e instalação de cicatrizador e T2 – instalação da prótese e T3 – 30 dias após a instalação da prótese. Em todas as etapas, no início da consulta, foi realizado bochecho com solução de clorexidina 0,12% (Periogard®, Colgate), por 1 minuto e ao final das consultas os pacientes receberam instruções e orientações de higiene bucal. (Figura1- Fluxograma).



Fonte: Autor

Figura 1. Fluxograma-Delineamento do estudo.

Os implantes dentários foram divididos em quatro grupos de acordo com o material inserido na interface pilar implante (IPI):

Grupo 1A: Controle (sem nenhum produto) (n=14/período)

Grupo 2B: Blue®M gel oral (Internacional BV-Holanda) (n=11/período)

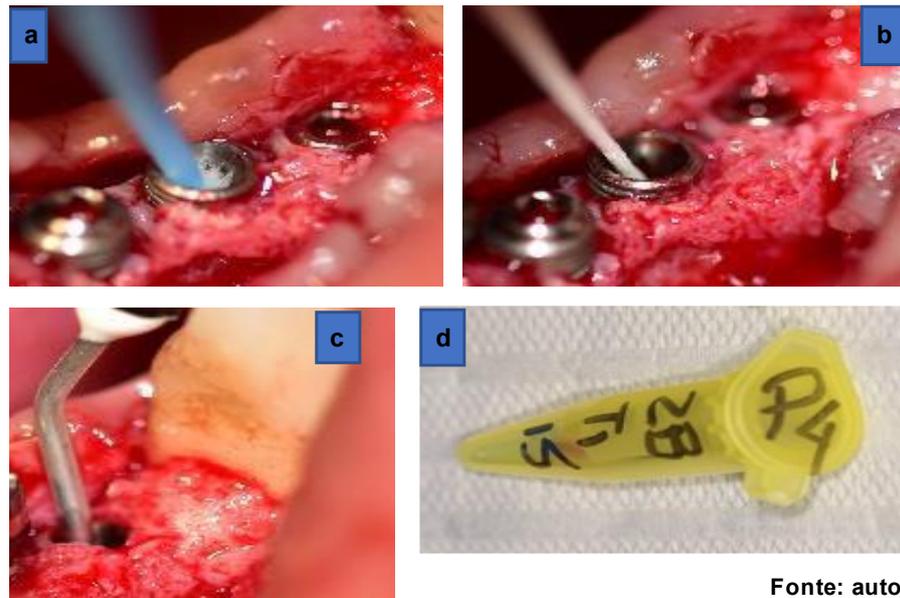
Grupo 3C: Clorexidina em gel 2% (Biodinâmica-Brasil) (n=10/período).

Grupo 4D: Proheal ® - (Biomacmed-Brasil) (n=12/período)

A distribuição dos implantes nos grupos foi realizada pelo sorteio do grupo que pertenceria o primeiro implante e os demais seguiram a ordem numérica a partir do primeiro escolhido (**1A**, 2B, 3C,4D - **2B**, 3C, 4D,1A - **3C**, 4D, 1A, 2B – **4D**,1A, 2B, 3C). No caso de implantes múltiplos a ordem seguiu o início na região distal superior direita, obedecendo o sentido horário do operador.

4.3 Cirurgia de instalação de implantes e coleta das amostras

Em T0, foi realizada anestesia terminal infiltrativa com Articaine 100® DFL (Cloridrato de Articaina 72mg + Epinefrina 18µg), incisão retilínea na crista do rebordo, relaxantes e descolamento do tecido mole expondo o osso. Foi realizada a instalação de implantes Cone Morse Black Fix® Profile– (Titaniumfix®- Brasil), com dimensões compatíveis ao planejamento estipulado. Após a instalação do implante, foi realizada a coleta da amostra na IPI com microaplicador (KG Sorensen®, Brasil) estéril e cone de papel (VDW® – Alemanha) (Figura 1), os dispositivos foram introduzidos um de cada vez, em todo o comprimento interno da IPI, esfregando nas paredes laterais realizando movimento circular e em seguida, foram acondicionados em microtubos tipo Eppendorf e imediatamente refrigerados e posteriormente, congelados à -20°C, para análises futuras.



Fonte: autor

Figura 2. Instalação do implante tempo T0 - (a) e (b) coleta da amostra com microaplicador estéril e com cone de papel estéril ;(c) inserção de produto de acordo com o grupo alocado - (d) armazenamento das amostras em microtubo identificado.

De acordo com o sorteio prévio, foram colocados no interior dos implantes, os produtos do grupo 2B, 3C ou 4D, exceto o grupo 1A que não recebeu nenhum produto em seu interior. A inserção do produto de acordo com o grupo determinado, foi realizada utilizando-se a própria seringa da formulação a qual o produto é acondicionado, trocando a agulha de inserção em cada aplicação. Para esta finalidade utilizamos agulhas curvas sem bisel 18G. (Figura 3). Após inserir os produtos no interior dos implantes, foi realizada a síntese com fios de nylon (Mononylon™ Ethicon™ – 4-0 – ETHICON™ – Johnson - Brasil).



Fonte: Autor

Figura 3. Agulha sem bisel para inserção dos produtos (Dental Needle – China)

Após 4 meses (mandíbula) e 6 meses (maxila) da instalação dos implantes, foi realizada a reabertura dos implantes e colocação de cicatrizadores (T1). Inicialmente, foi realizada bochecho com clorexidina 0,12% (Periogard®), anestesia local com cloridrato de Prilocaína 54mg e Felipressina 0,054UI (Prilonest ® DFL), realizando a incisão, descolamento dos tecidos, exposição do implante, remoção do tapa implante, coleta da amostra com microaplicador estéril e cone de papel estéril, inserção do produto alocado e instalação do cicatrizador.(figura 3)

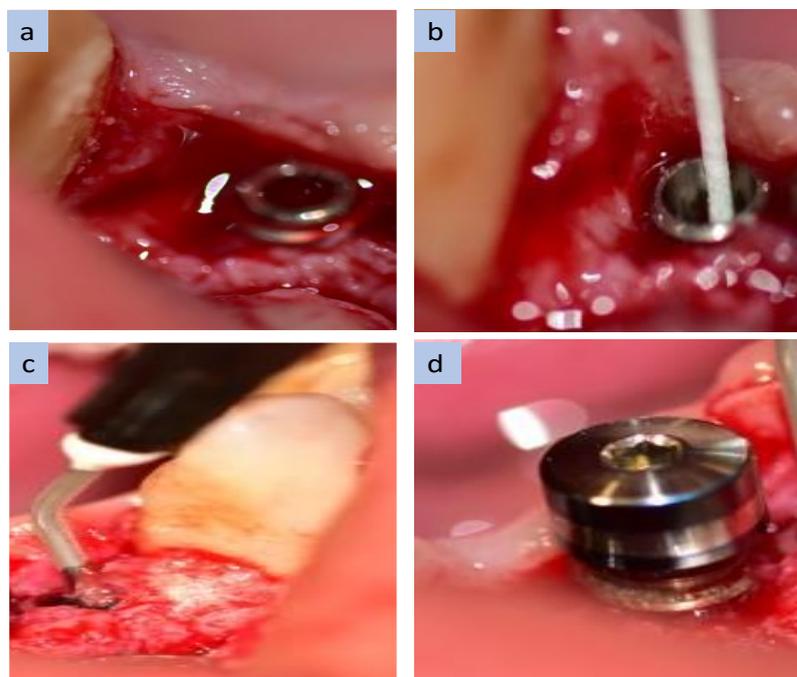
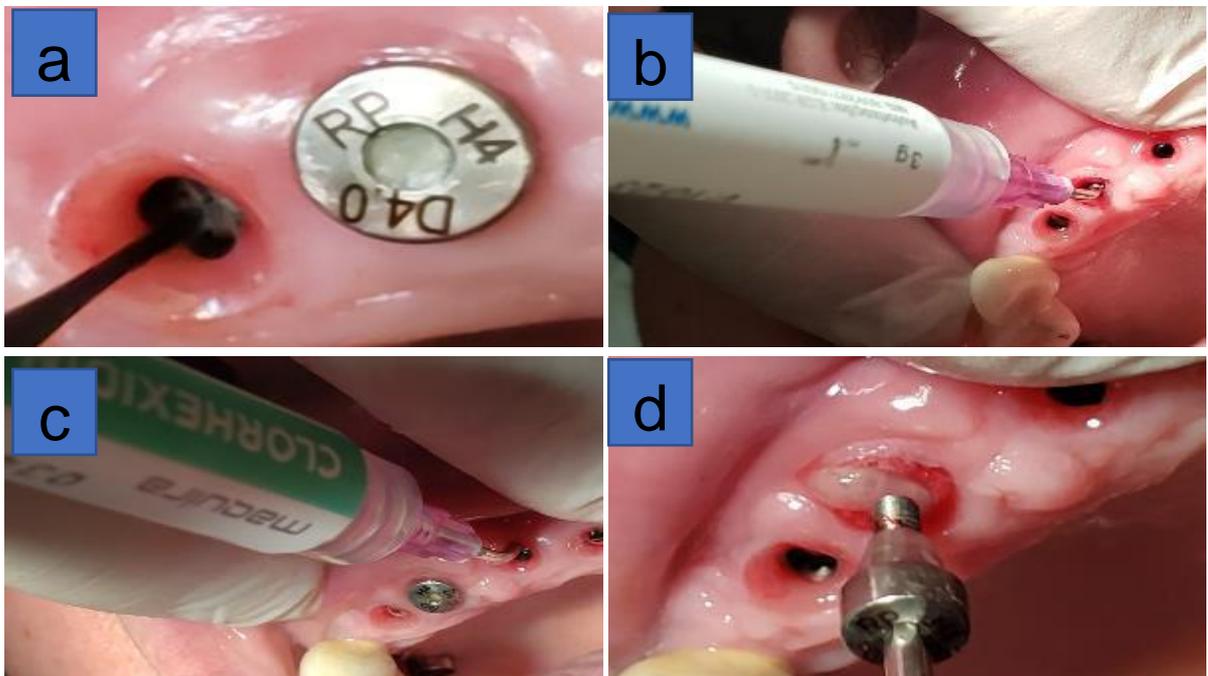


Figura 4. No período T1, cirurgia de reabertura do implante. (a)remoção do cover; (b) coleta da amostra com cone de papel estéril; (c)inserção do produto definido em T0; (d)colocação do cicatrizador no implante.

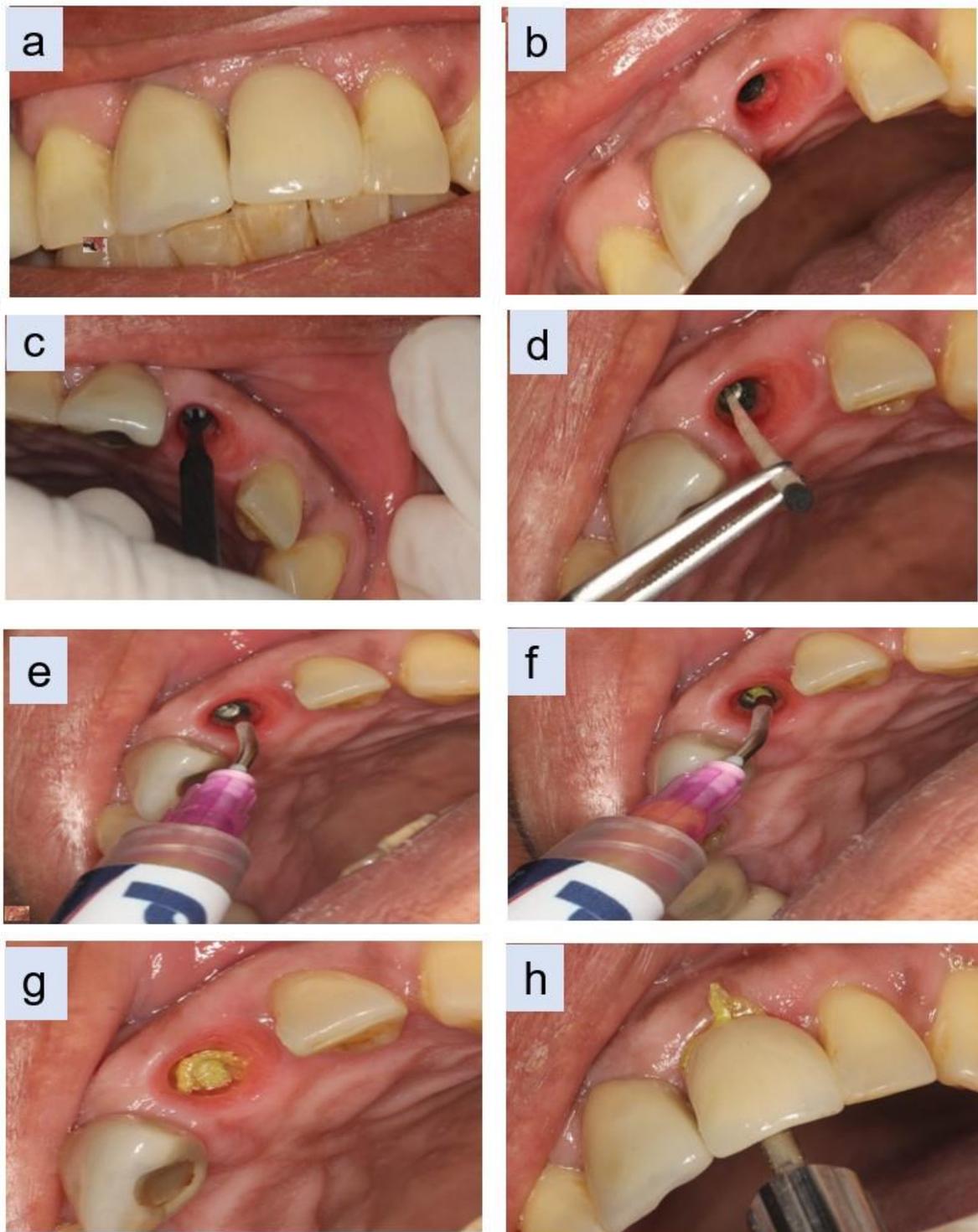
O material coletado foi armazenado em microtubos tipo Eppendorf, resfriado e posteriormente, congelado à -20°C para análises futuras. O interior dos implantes foi preenchido com o mesmo material colocado em T0 seguido da instalação do cicatrizador de dimensões compatíveis com o local operado. Após inserir os produtos no interior dos implantes, foi realizada a síntese com fios de nylon (Mononylon™ Ethicon™.4-0 – ETHICON™ – Johnson - Brasil). (Figura 4)



Fonte: autor

Figura 5. Nas fases de moldagem e prova das próteses a) coleta da amostra com microaplicador estéril dentro do implante - (b) inserção do gel Blue®M, antes da recolocação do cicatrizador- (c) inserção de clorexidina gel a 2%, antes da recolocação do cicatrizador - (d) recolocação de cicatrizador com o extravasamento do produto.

Após 1 mês da reabertura, foi realizada a moldagem de transferência de implantes para confecção de prótese e depositado os mesmos produtos durante todo o processo de provas até a instalação definitiva da prótese(T2). Após 1 mês da instalação da prótese foi realizado um acompanhamento, a qual foi removido a prótese já instalada e realizado a coleta do material internamente do implante(T3). Em todo o processo foi realizada bochecho com clorexidina 0,12%, por 1 minuto antes da remoção do cicatrizador no processo da confecção da prótese e realizado a coleta do material do interior do implante, utilizando-se de microaplicador e cones de papel estéreis. O material coletado foi armazenado em microtubos tipo Eppendorf, resfriado e posteriormente, congelado à -20°C para análises posteriores. Após foi colocado antes do fechamento com cicatrizador e posteriormente a prótese a inserção dos produtos de estudo inicialmente utilizados. (Figura 5 e 6).



Fonte: Autor

Figura 6. Tempo T3- controle após 1 mês da instalação da prótese :(a) prótese instalada; (b) remoção da prótese; (c) e (d) coleta da amostra com microaplicador estéril e cone de papel estéril; (e) e (f) antes e durante a colocação da pomada Proheal®; (g) pós a colocação da pomada Proheal®; (h) reinstalação da prótese com extravasamento da pomada.

4.4. Etapa Laboratorial

As 188 amostras foram coletadas e imediatamente armazenadas num freezer a -20°C , aguardando os processos de extração e purificação de DNA e análise por qPCR-RT (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real).

4.4.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA total das amostras, foi utilizado o kit de extração Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) de acordo com as orientações do fabricante (Figura 7)



Fonte: autor

Figura 7. kit de extração de DNA PureLink® Genomic DNA Mini kit – Invitrogen® - conjunto de soluções para extração e purificação do DNA.

Inicialmente, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. (Figura 8).



Fonte: autor

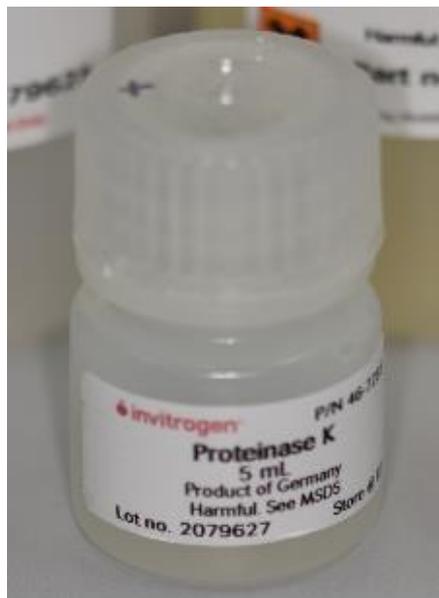
Figura 8. Amostras coletadas descongelando à temperatura ambiente antes da extração do DNA.

Em seguida, foi acrescentado 200 μ L de solução tampão PBS (Phosphate Bufferid Saline) misturado com agitador de soluções Phoenix AP59® (figura 9) obtendo-se uma solução homogênea. Juntamente com 20 μ L de proteinase K para realizar a lise das células. (figura 10)



Fonte:autor

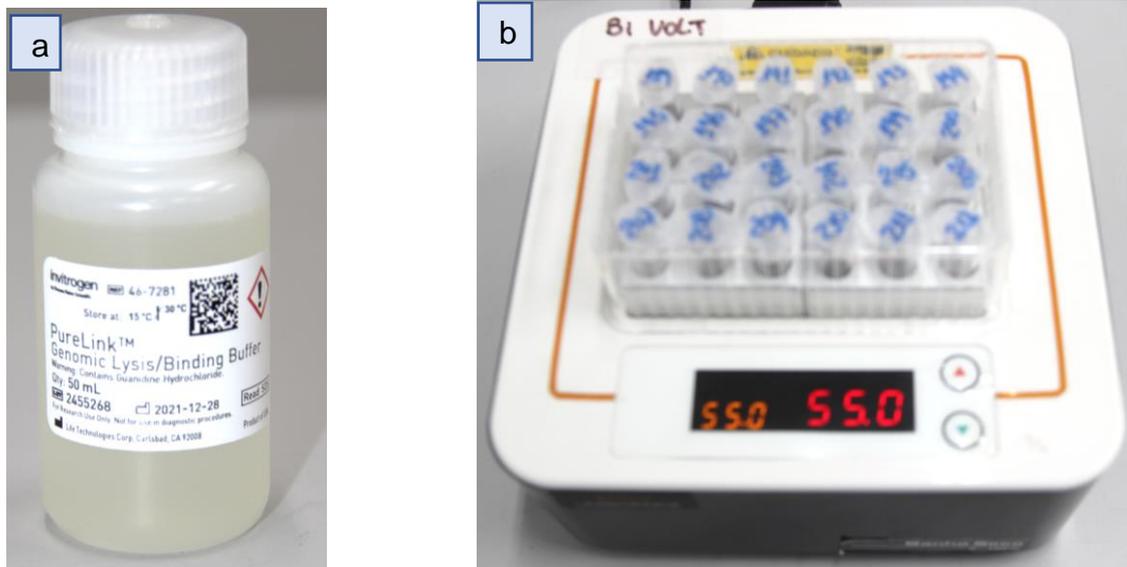
Figura 9. Agitador de soluções para misturar as amostras - Vórtex -AP59 – Phoenix®



Fonte:autor

Figura 10. Proteinase K - Invitrogen® solução para realizar a lise das células da amostra.

Foi adicionado ao lisado, 200 μ L de Buffer do tampão da lise (Genomic Lysing / Binding Buffer) e realizado vórtex rápido. As amostras permaneceram por 10 minutos à 55°C em miniestufa (Banho à seco 0 – 100° - UNISCIENCE®) (figura 11).



Fonte: autor

Figura 11. (a) Genomic Lysing/Binding Buffer (PureLink®) solução para realizar a lise dos microorganismos; (b) Miniestufa -Uniscience® aparelho que aquece para auxiliar na lise dos microorganismos.

Após a incubação, a amostra foi centrifugada, por 3 segundos (Figura 12), para retirar resíduos da tampa do microtubo. Foi adicionado 200 μ L etanol puro (ETOH absoluto) ao lisado (misturado posteriormente por vórtex por 3 segundos, para homogeneização). O procedimento de purificação foi projetado para a purificação genômica do DNA utilizando spin columns. (figura 13). Toda solução foi passada para colunas de sílica, num total aproximado de 620 μ L e centrifugados à 10.000g/RCF por 1 minuto (MIKRO200R® – Hettich® Zentrifugen). (Figura 14).



Fonte: autor

Figura 12. microcentrifuga D1008 DLAB Scientific Co., Ltd. aparelho de misturar e homogenizar as amostras.



Fonte: autor

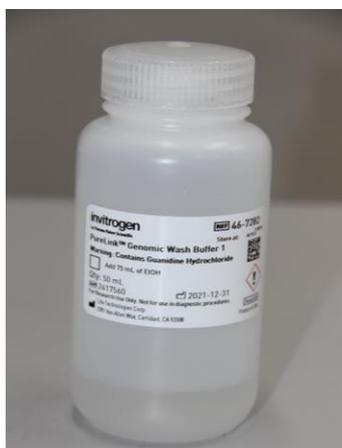
Figura 13. (a) amostra com as solução de lise sendo transferida para filtragem- (b) solução com a amostra transferida na coluna de filtragem para purificação do DNA.



Fonte: autor

Figura 14. Centrífuga MIKRO200R® – Hettich® Zentrifugen utilizada para centrifugação durante o processo de lavagem e purificação do DNA.

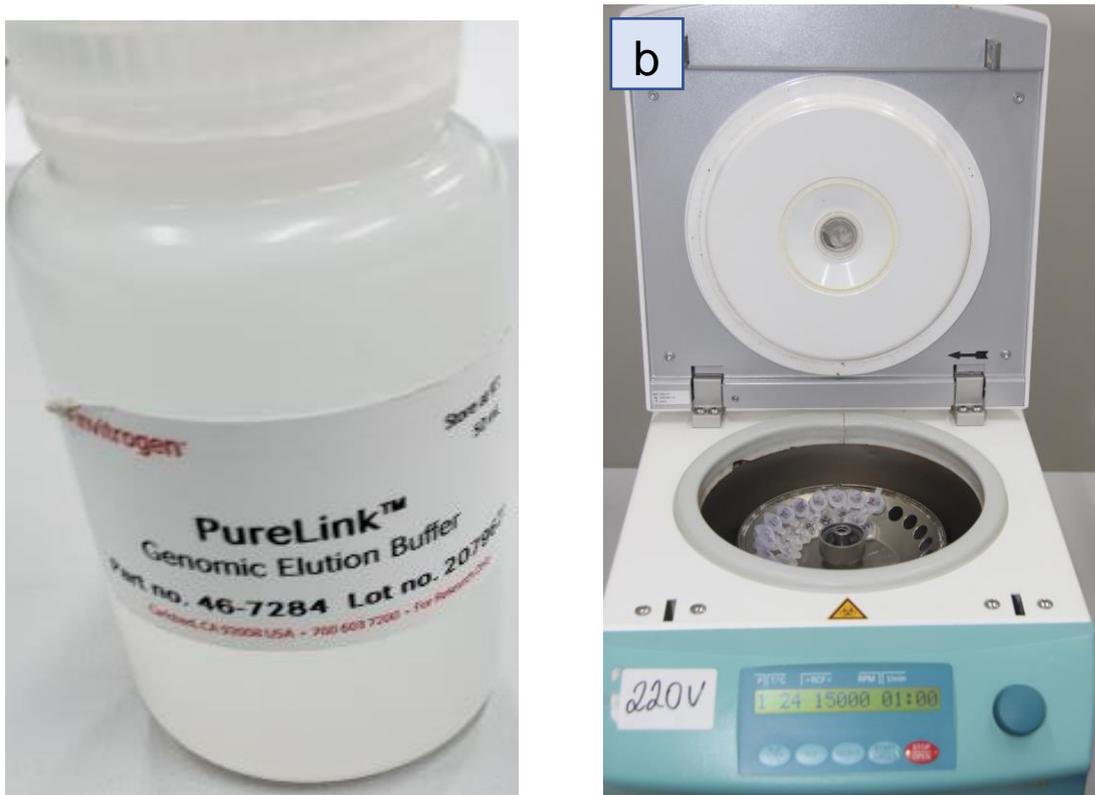
O tubo coletor foi descartado, mantendo-se a coluna de Sílica. A coluna de sílica foi acomodada no novo tubo coletor, sendo depositado 500 μ L da solução de lavagem Genomic Wash Buffer 1 (figura 15a). Imediatamente foi centrifugado à 10.000g RCF, por 1 minuto. O tubo coletor é descartado e a coluna de sílica é acomodada em novo tubo coletor, que recebeu 500 μ L da solução de lavagem Genomic Wash Buffer 2. (Figura 15b). Foi novamente centrifugado à 10040g RCF, por 1 minuto.



Fonte: autor

Figura 15. Soluções para fazer a lavagem da amostra durante o processo de purificação do DNA. (a) Genomic Wash Buffer 1 e (b) Genomic Wash Buffer 2 -PureLink - Invitrogen®

Após centrifugação, o tubo coletor é descartado, e a coluna de sílica é acomodada em microtubos tipo Eppendorf de 1,5ml, previamente identificados. Foi depositado 50µL de solução de eluição (Genomic Elution Buffer) (Figura 15 a) e aguardado 1 minuto em temperatura ambiente. Centrifugado em velocidade máxima 15000g RCF, por 1 minuto (figura 15b). A coluna de sílica foi descartada e o Eppendorf de 1,5ml contendo o extrato purificado de DNA foi congelado à -20°C.

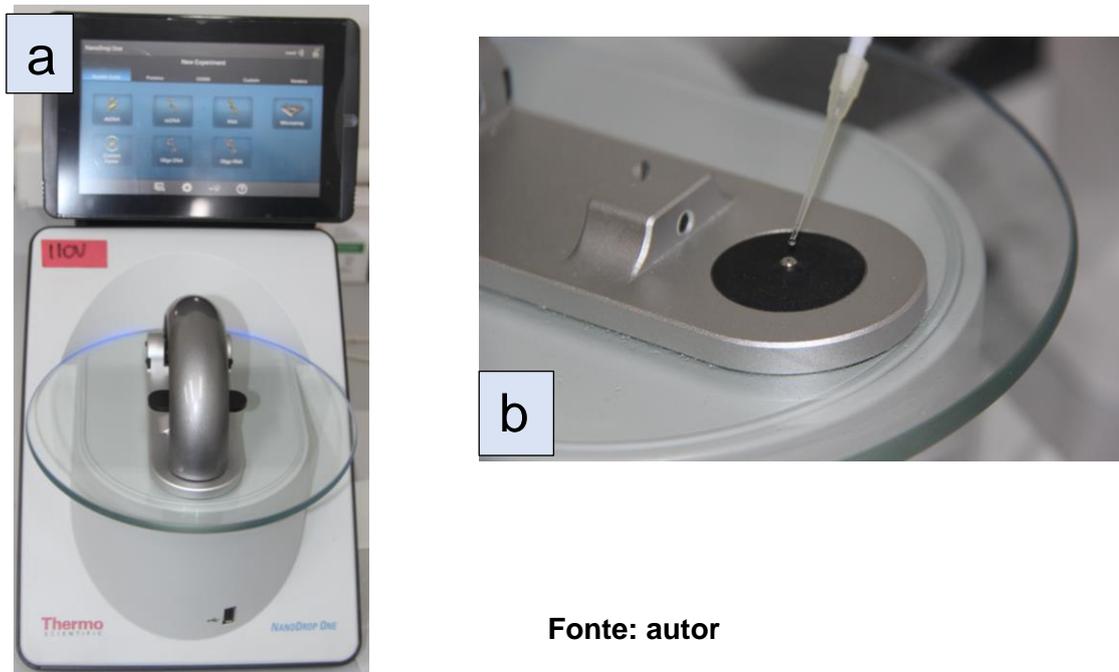


Fonte:autor

Figura 16. (a) solução Genomic Elution Buffer - PureLink - Invitrogen® para a purificação do DNA; b) Acomodando microtubos para centrifugação final.

4.4.2. Quantificação e qualificação das amostras de DNA

Após extração do DNA, as amostras, foram analisadas em relação a sua quantidade e qualidade do DNA obtido, utilizando o espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop One®. (Thermo Fisher Scientific- EUA). (Figura 17)



Fonte: autor

Figura 17. Quantificação de DNA total da amostra (a) espectrofotômetro Nano Drop One® - (Thermo Scientific) – (b) Depositando de 1ul de amostra para quantificação da leitura.

4.4.3 Detecção e Quantificação das bactérias totais pela Reação de Cadeia Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A quantificação e identificação das bactérias pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT) foi feita utilizando o Kit SYBR® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), segundo as instruções do fabricante. O par de primers utilizados para a detecção e quantificação das bactérias totais está apresentado na tabela 1.

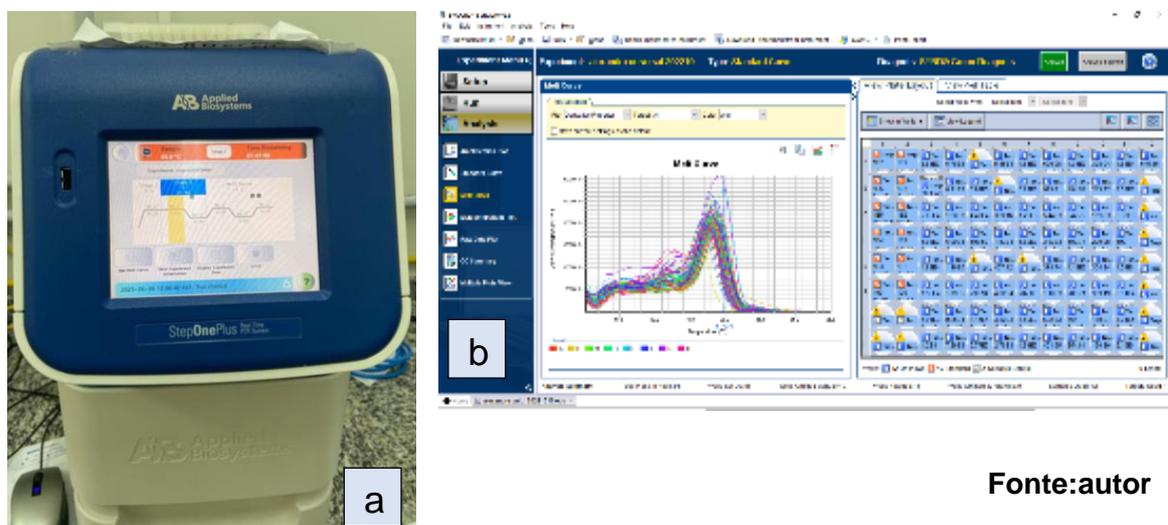
Tabela 1 – Descrição de sequência de Primers Uni_16S para qPCR utilizado para identificação e quantificação de bactérias.

Primer	Sequência
Uni_16S fwd	5' CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG 3'
Uni_16S rev	5'GCT TGA CGG GCG GTGT 3'

Fonte: Autor

As reações foram feitas seguindo a termociclagem que alcança 95°C, por 20 segundos, seguido de 40 ciclos, com a temperatura de 95°C por 3 segundos diminuindo para 60°C, por 30 segundos. A curva de Melt foi realizada aumentando a temperatura à 95°C, por 15 segundos, diminuindo para 60°C, por 1 minuto e elevando a 95°C por 15 segundos.

O equipamento utilizado foi StepOne (Applied Biosystems, LifeTech, EUA), e os dados foram analisados utilizando o software StepOne™. (Figura 18)



Fonte: autor

Figura 18. (a) Termocicladora StepOne (Applied Biosystems, LifeTech, EUA) utilizado; (b) software StepOne™ para leitura da reação em cadeia polimerase em tempo real.

4.4.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e como os dados se apresentaram não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc Dunn's foi utilizado para comparações entre diferentes grupos e períodos utilizando o software estatístico Graphpad (Graphpad Software inc., San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1 Caracterização da População Estudada

Foram instalados no total de 47 implantes em 16 pacientes sendo 11 do gênero feminino (68,75%) e 5 masculinos (31,25%) com média de idades de $55,4 \pm 11,8$ anos.

Todos os implantes incluídos neste estudo foram avaliados em todos os períodos experimentais propostos.

5.2 Detecção e quantificação de bactérias totais

As quantidades de bactérias totais de todos os grupos nos tempos experimentais avaliados estão descritas na tabela 2 e gráfico 1

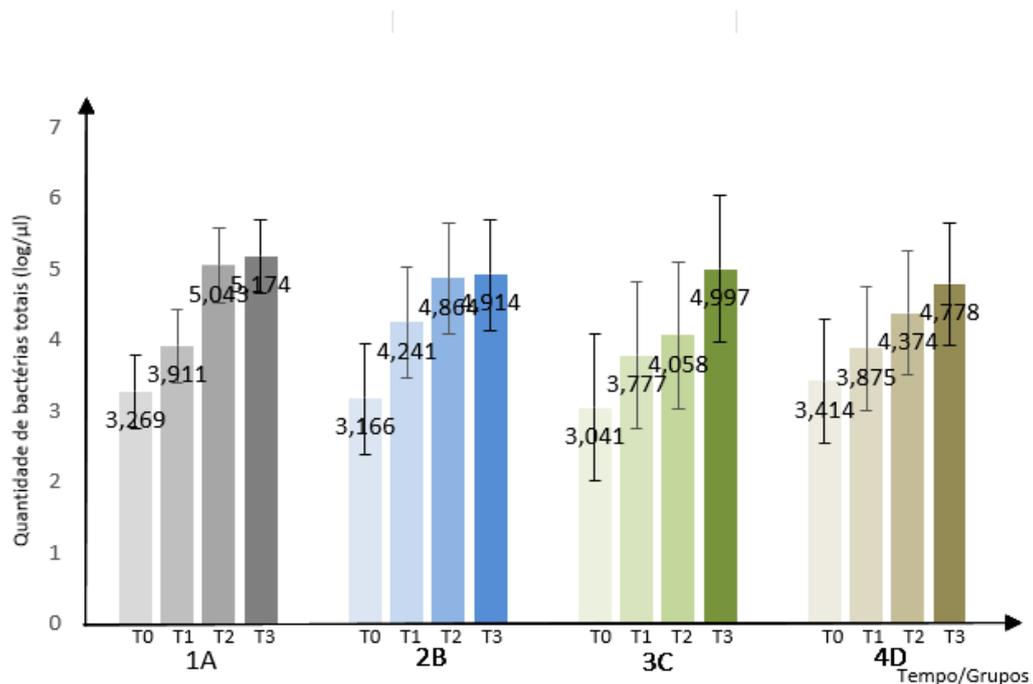
Tabela 2. Quantificação de Bactérias Totais pelo qPCR dos grupos nos períodos experimentais

Grupos	T0	T1	T2	T3	p
Controle	3,269±0,4148	3,911±0,8453	5,043±1,225	5,174±1,007	<0,0001
Blue®M	3,166±0,5926	4,241±1,257	4,864±0,8072	4,914±1,025	0,0002
Clorexidina	3,041±0,4682	3,777±0,8589	4,058±1,327	4,997±1052	0,0366
Proheal®	3,414±0,5189	3,875±0,7805	4,374±1,043	4,778±0,8728	0,0020
P	0,9999	0,9999	>0,9999	>0,9999	

A média com respectivo desvio padrão da quantidade de bactérias totais de cada grupo nos tempos T0, T1, T2, T3. Teste Kruskal-Wallis.

Foi observado, a presença de contaminação bacteriana em todos os grupos e em todos os tempos experimentais avaliados, inclusive no T0. Em todos os grupos as quantidades de bactérias foram crescentes com o passar do tempo indicando um aumento do fluxo bacteriano na interface pilar protético e implante.

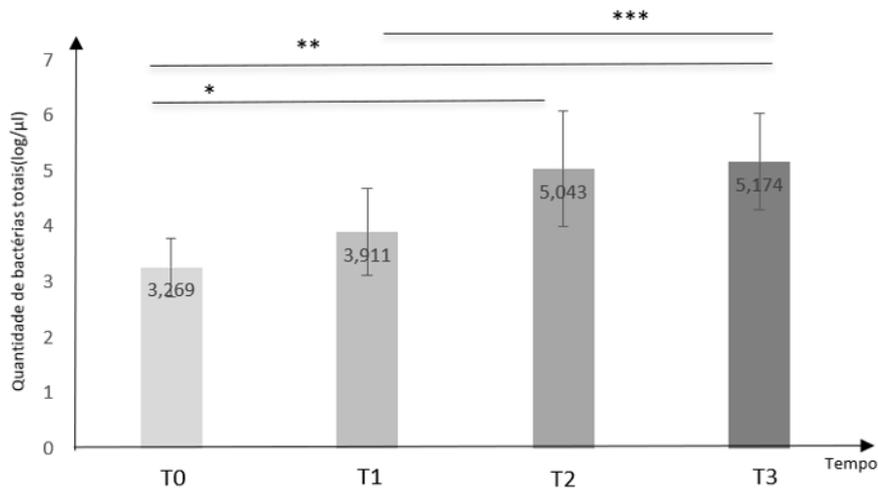
Gráfico 1. Quantificação de bactérias totais dos grupos pelos períodos experimentais (tempos).



Comparação da quantidade de bactérias totais na média com o respectivo desvio padrão com os tempos e todos os grupos. Teste de Kruskal-Wallis.

No grupo Controle (1A), observou o aumento da quantidade de bactérias totais com o passar dos tempos. Apresentaram diferenças significativas estatisticamente entre os tempos T0 com T2 ($p=0,0003$), entre os T0 com T3 ($p<0,0001$) e entre os tempos T1 com T3 ($p=0,0362$) como mostra o gráfico 2.

Gráfico 2. Quantificação de bactérias totais no grupo controle (1A) nos tempos T0, T1, T2, T3.

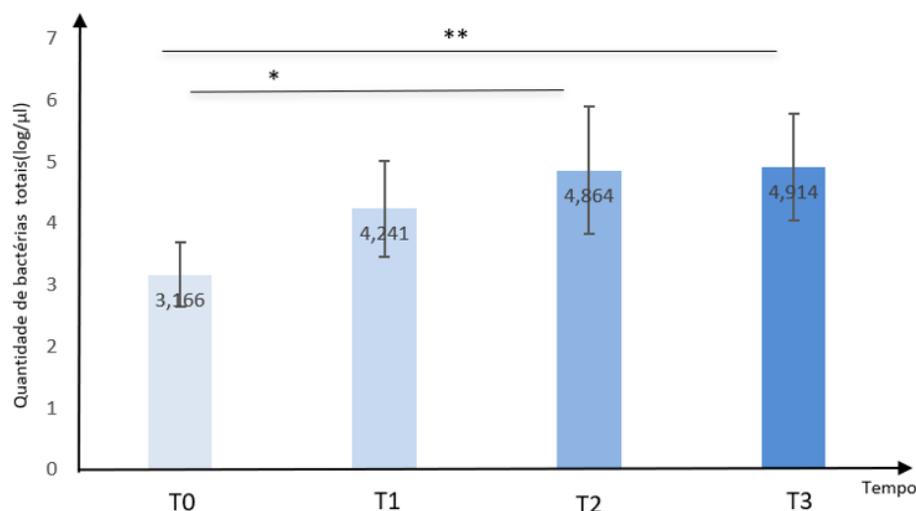


Teste Kurkal-Wallis post hoc Dunn's no grupo controle(1A) mostrando a quantidade de bactérias totais na média com o desvio padrão nos tempos.

* T0xT2-p=0,0003, ** T0xT3-p<0,0001, *** T1xT3-p=0,0362 .

No grupo Blue®M (2B), observou o aumento da quantidade de bactérias totais com o passar dos tempos. A diferença estatística significativa ocorreu entre os tempos T0 com T2 (p=0,0011) entre os tempos T0 com T3 (p=0,0009) conforme o gráfico 3.

Gráfico 3. Quantificação de bactérias totais no grupo Blue®M (2B) nos tempos T0, T1, T2, T3.

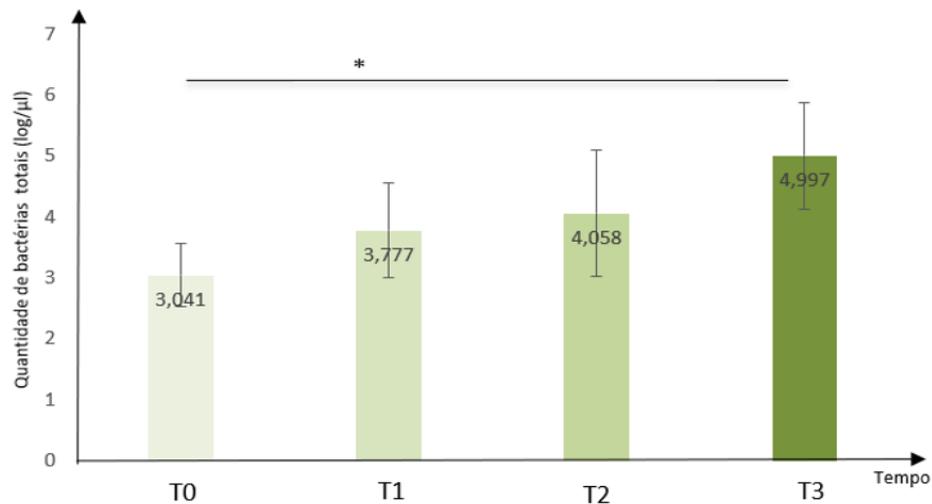


Teste Kruskal-Wallis post hoc Dunn's no grupo Blue®M(2B) que mostra a quantidade média de bactérias totais com o desvio padrão nos tempos.

* T0xT2- p=0,011, ** T0xT3- p=0,0009.

No grupo Clorexidina (3C), os resultados obtidos e verificados nos gráficos 4 observou diferença significativa estatisticamente entre os tempos T0 com T3 ($p=0,0005$).

Gráfico 4. Quantidade de bactérias totais no grupo Clorexidina (3C) nos tempos T0, T1, T2, T3.

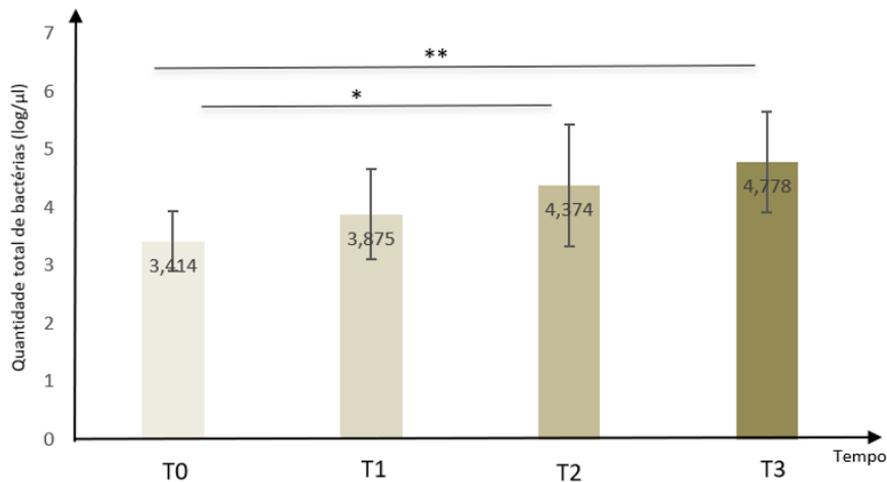


Teste Kruskal-Wallis post hoc Dunn's no grupo Clorexidina(3C) mostra a quantidade de bactérias totais na média com o desvio padrão nos tempos.

*** T0xT3- $p=0,0005$**

No grupo Proheal® (4D), observou diferença significativa estatisticamente entre os tempos T0 com T2 ($p=0,0448$) e entre os tempos T0 com T3 ($p=0,0032$) conforme o gráfico 5.

Gráfico 5. Quantificação de bactérias totais no grupo Proheal®(4D) nos tempos T0, T1, T2, T3.

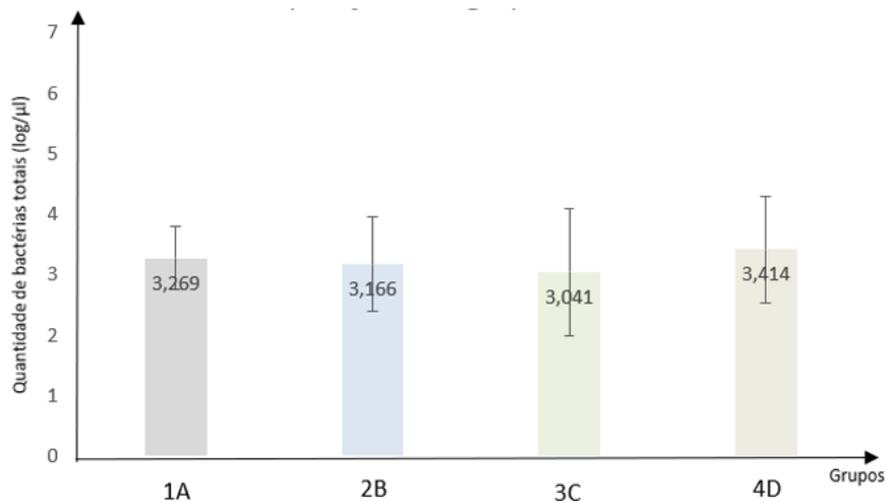


Teste Kruskal-Wallis post hoc Dunn's no grupo Proheal®(4D) mostra a quantidade de bactérias totais na média de com o desvio padrão nos tempos.

* T0xT2-p=0,0448, **T0xT3- p=0,0032.

Os resultados observados quando comparados intergrupos no tempo T0, apresentam contaminação bacteriana só que não tiveram diferença significativa estatisticamente($p=0,99999$) na comparação dos grupos conforme gráfico 6.

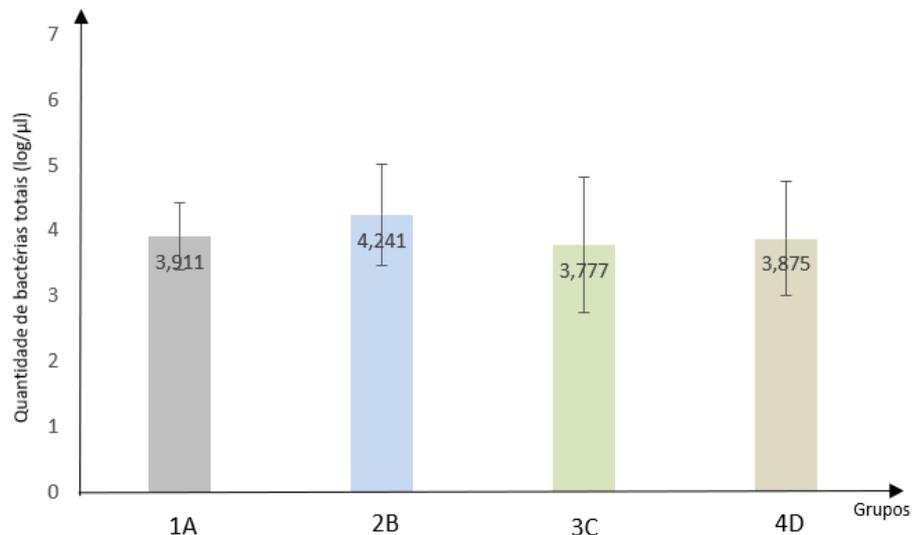
Gráfico 6. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T0.



A média com respectivo desvio padrão da quantidade de bactérias totais no tempo T0 comparando os grupos 1A,2B,3C e 4D.

No tempo T1, comparando os grupos observou-se que apresentaram contaminação bacteriana, porém não foi observado diferença estatisticamente entre grupos ($p=0,9999$) conforme o gráfico 7.

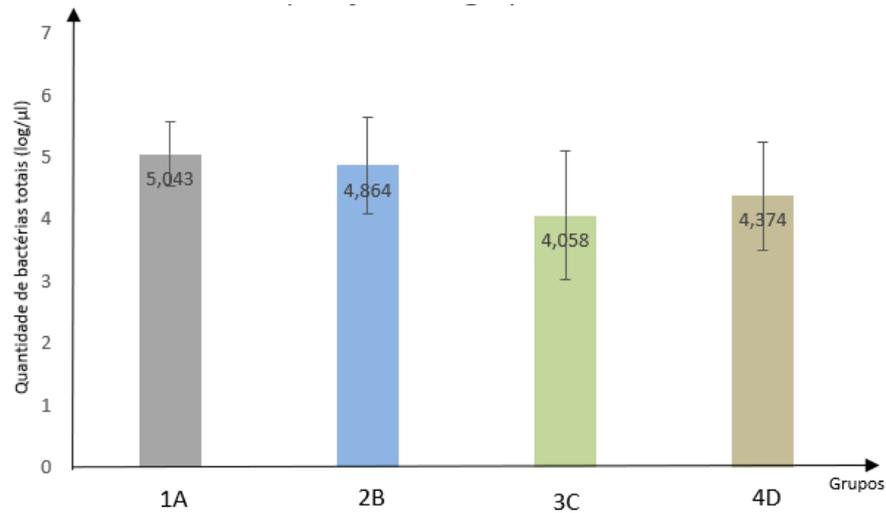
Gráfico 7. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T1.



A média com respectivo desvio padrão da quantidade de bactérias totais no tempo T1 comparando os grupos 1A,2B,3C e 4D.

No tempo T2, observou que existe contaminação bacteriana, mas não houve diferença estatisticamente significativa. Na comparação entre o grupo controle com o grupo Blue®M e com o Proheal® ($p>0,9999$), grupo controle com grupo Clorexidina ($p=0,4367$), o grupo Blue®M com o grupo Clorexidina ($p=0.6789$), o grupo Blue®M com Proheal® e Clorexidina com Proheal® ($p>0,9999$).

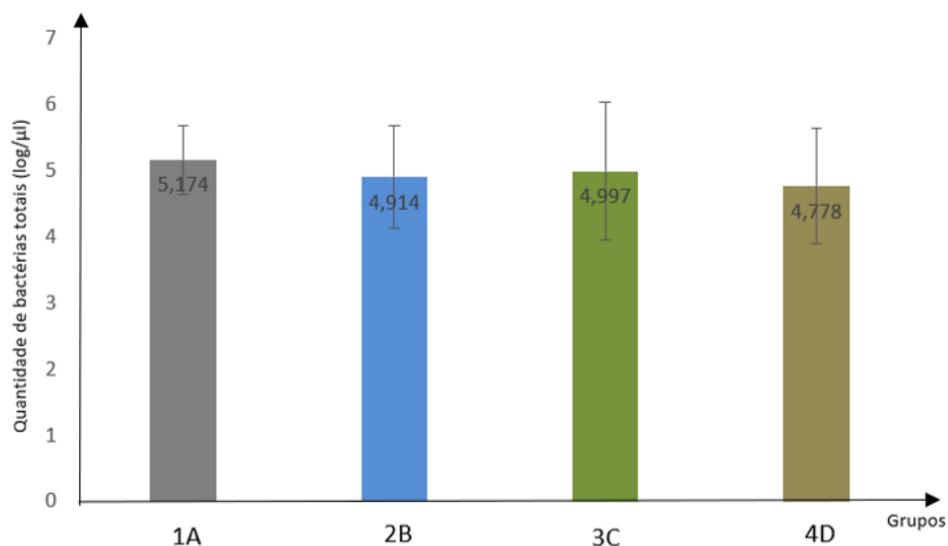
Gráfico 8. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T2.



A média com respectivo desvio padrão da quantidade de bactérias totais no tempo T2 comparando os grupos 1A, 2B, 3C e 4D.

Já no tempo T3, o gráfico 9 observou que existe a contaminação bacteriana em comparação intergrupos, mas não houve diferença estatística significativa ($p > 0,9999$).

Gráfico 9. Comparação intergrupos da quantidade de bactérias totais no tempo T3.



A média com respectivo desvio padrão da quantidade de bactérias totais no tempo T3 em comparação com os grupos 1A, 2B, 3C e 4D.

Como observamos nos gráficos, em todos os tempos teve contaminação bacteriana na comparação intergrupos nos mesmos tempos e demonstrando que não existem diferenças significativas estatisticamente.

6. Discussão

A cavidade bucal é colonizada por mais de 700 espécies de microrganismos conhecidos (Costa et al., 2020). Vários estudos prévios têm enfatizado sobre a contaminação da IPI após a instalação de implantes osseointegrados de dois componentes (Canullo et al., 2015; Mancini et al., 2016). Deve-se considerar que a grande maioria dos implantes disponíveis no mercado são sistemas de dois componentes: o implante e o pilar protético. Assim, a presença dos microgaps são inevitáveis, favorecendo o fluxo bacteriano que poderiam atuar no estabelecimento da progressão peri-implantite, resultando na perda de tecido ósseo e gengival ao redor do implante (Mishra et al., 2017; Caricasulo et al., 2018; Vinhas et al., 2020; Fernandes et al., 2022). Ressaltando que a estabilidade dos tecidos peri-implantares é fundamental no sucesso do implante ao longo prazo (Rismanchian et al., 2012).

No presente estudo foram observados a presença de bactérias em todos implantes, independentemente do produto antimicrobiano inseridos no interior dos implantes, evidenciando a contaminação bacteriana via infiltração pelo microgap e/ou quebra da cadeia asséptica durante a manipulação do implantes e/ou componentes protéticos, desde o momento da instalação cirúrgica do implante até 1 mês após a instalação prótese. Esses resultados mostraram que apesar da conexão cone morse dos implantes diminuir a ocorrência de infiltração bacteriana, comparada as conexões hexágono externo ou interna, não impede da contaminação, corroborando com com dados existentes estudos prévios (Mishra et al., 2017; Bittencourt et al., 2021; Yu et al., 2022). Diferentemente do estudo do Grego e Napimoga (2022) que demonstraram a ausência de microgap nos implantes do cone morse e conseqüentemente ausência da infiltração bacteriana. Contudo, deve se ressaltar que foi uma avaliação *in vitro* e realizado em condições estáticas de incubação, isto é, sem simulações de carga mastigatória, não representando as condições reais em pacientes.

Na tentativa de diminuir ou inibir essa infiltração na IPI, diversos produtos com ação antimicrobiana e/ou materiais de vedação foram utilizados na IPI, alguns foram capazes de diminuir a quantidade bacteriana mas não foram capazes de impedir a contaminação na IPI. O presente estudo teve objetivos de testar clinicamente a eficácia do gel Blue®M, pomada Proheal® ou gel de clorexidina 2% na prevenção ou redução da contaminação bacteriana na interface implante e pilar protético.

Dos produtos antimicrobianos, o mais utilizados nas pesquisas de infiltração bacteriana na IPI e na prática clínica é a clorexidina. Devido a sua propriedade bactericida e bacteriostática de amplo espectro em controle da microbiota bacteriana bucal, por outro lado, o seu uso prolongado está relacionado há alguns efeitos colaterais como alteração de paladar, sensação de dormência na língua, pigmentações marrom-amareladas nos dentes, restaurações e no dorso de língua (Carcuac et al.,2015;Fiorillo et al.,2019). Segundo o trabalho de Sinjari et al. (2018) o uso de gel de clorexidina a 0,20% utilizado na interface pilar implante reduziu a perda óssea marginal peri-implantar no acompanhamento por 12 meses.

Já o gel oral Blue®M tem em sua fórmula o oxigênio ativo que tem a uma ação antibacteriana para espécies reativas ao oxigênio causando peroxidação nas paredes celulares bacterianas e a lactoferrina que desestrutura a membrana do microorganismo, fazendo assim o controle bacteriano pois apresentam menos efeitos colaterais, além do oxigênio ativo ser um cicatrizante o que ajudaria na reparação tecidual do tecido peri-implantar (Niveda e Kaarthikeyan,2020). O trabalho de Han (2019) in vitro demonstra uma diminuição na infiltração com este produto em um tipo específico de bactéria(*P.gingivalis*) em contrapartida Miyahira(2022)em um trabalho clínico randomizado demonstrou que esse produto não impediu a infiltração bacteriana.

O outro produto antibacteriano investigado foi a pomada Proheal® que é a base de iodofórmio, o iodofórmio é um produto muito utilizado na endodontia devido sua ação antimicrobiana e reparador de lesões periapicais usado em diversos protocolos (Cerqueira et al,2008). Na implantodontia este produto como pomada, tem ação antimicrobinana, além de agir como método físico de barreira na interface pilar implante (Cruz,2002; Silva et al.,2006; Cruz et al.2011). Pereira et al. (2017) em seu trabalho in vitro demonstrou que a pomada Proheal® teve uma ação efetiva contra microorganismo do complexo vermelho anaeróbica que residem no interior dos implantes e bolsas peri-implantares. Ferrari et al. (2021) também demonstrou eficácia do produto na IPI contra contaminação por *P.gingivalis* in vitro. Um outro estudo demonstrou que após 5 anos, o Proheal® apresentou atividade antisséptica, apesar da atividade organoléptica reduzida reforçando desta forma a eficácia do produto (Cruz,2002).

A técnica de qPCR-RT amplamente utilizada em pesquisa científica foi empregada nesse estudo como método para a detecção e quantificação de bactérias

em interface IPI in vivo. É uma tecnologia de diagnóstico sensível, precisa e rápida que oferece vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultura microbiana, incluindo a detecção de microbiota não viáveis e com desafios para o cultivo, além da quantificação absoluta (Forootan et al., 2017).

Através dos resultados obtidos neste trabalho verificou-se a presença de bactérias no T0, logo após a instalação do implante, em todos os quatro grupos. Contrariando o esperado, uma vez que o implante é fornecido estéril pelos fabricantes. Essa contaminação inicial pode ser atribuída a contaminação no processo de fabricação do implante ou quebra da cadeia asséptica durante a cirurgia da instalação do implante. O processo de confecção e manufatura implante seguem as normas de esterilização especificado pela Anvisa, no entanto, há possibilidade ter algum material genético bacteriano não viável remanescente que poderia ter sido identificado pela metodologia do qPCR empregada no presente estudo (Forootan et al. 2017). Uma vez que a técnica de biologia molecular tem alta sensibilidade e assim é capaz de identificar fragmentos de material de DNA não viáveis. Além disso, ainda há possibilidade de existir DNA não viáveis remanescentes instrumentais cirúrgicos de instalação do implante que pode ser transferidos durante a cirurgia. Por último, deve-se considerar a possível contaminação com a própria saliva do paciente durante a cirurgia, pois sabe-se que a saliva é altamente colonizada por diversos tipos de microrganismos, a contaminação de instrumentais com saliva é uma realidade clínica muito comum durante a cirurgia de instalação de implantes dentários.

No momento de reabertura do implante (T1), foi detectado um aumento da quantidade de bactérias, independente do grupo analisado, entretanto não mostraram diferenças entre os grupos. Sendo assim o aumento da quantidade bacteriana observada de T0 para T1, podem ser atribuídos a proliferação destes durante o período de osseointegração do implante, indicando que as bactérias detectadas no T0 poderiam estar viáveis. Tendo em vista, que todos os implantes estavam submersos na gengiva sem exposição ao meio bucal durante o período de osseointegração, acredita-se que o aumento das bactérias não seria proveniente da infiltração da saliva. Uma outra hipótese seria a contaminação no momento da cirurgia de reabertura do implante, o qual é exposto ao meio bucal. O período T0 foi importante para mostrar que o aumento de quantidade bacteriana no interior do implante observado no T1, nas amostras coletadas na cirurgia de reabertura podem ser atribuídos a proliferação destes durante o período de osseointegração do implante.

Nos tempos T2 e T3 demonstraram que o aumento da quantidade de bactérias totais independente do grupo avaliado sugerindo que a infiltração e/ou proliferação de microrganismos e nutrientes é constante. Levando em consideração que os implantes ficaram expostos aos fluidos na cavidade bucal a partir do tempo T1, além da manipulação dos componentes decorrente aos procedimentos clínicos que são submetidos como moldagem do implante, prova do pilar e instalação definitiva da prótese. Todas as etapas dos procedimentos podem ter colaborado para o aumento dessa infiltração bacteriana neste período, pois sabemos que existe um espaço interno nos implantes favorecendo o acúmulo do infiltrado bacteriano como demonstra o trabalho de Scarano et al.,2016. Então o aumento da quantidade de bactérias totais com o passar dos tempos mostraram que o fluxo bacteriano, possivelmente a todos esses fatores citados acima e principalmente ao microgap. E uma das formas de selar estes espaços e microgaps e usar produtos a base de silicone que conseguem vedar os microgaps como demonstram os trabalhos apresentados Fernandes et al.,2022 e Yu et al., 2022.

Quando os produtos são comparados em cada tempo experimental, não apresentaram diferença estatisticamente significantes entre eles, inclusive como o grupo Controle que não recebeu nenhum material de preenchimento.

Uma possível hipótese seria que as substâncias ativas dos produtos são capazes de diminuir a contaminação bacteriana, porém possuem períodos de ação efetiva menor do que os períodos experimentais investigados.

Uma outra hipótese a considerar, o produto inserido no IPI pode causar uma diminuição do travamento friccional entre as superfícies de contato das paredes dos componentes protéticos e implantes devido as propriedades físicas do implante. Além dos diferentes tempos de solubilização causados pelos fluidos orais poderiam causar uma maior microgap e conseqüentemente uma maior contaminação na interface IPI.

De acordo com os resultados obtidos, nenhum produto testado neste estudo foi capaz de impedir ou reduzir a infiltração, entretanto, podem ter causado alterações na composição bacteriano encontrados na IPI, portanto há uma necessidade de estudos futuros para determinar o perfil microbiano no microambiente. Além disso, tendo em vista que a literatura relativa as pesquisas clínicas da contaminação bacteriana é escassa, mais estudos clínicos longitudinais são necessários, a fim de determinar um protocolo de uso de produtos na IPI para manutenção da saúde peri-implantar.

7. Conclusão

Dentro das limitações e face aos resultados observados por este estudo clínico randomizado, concluiu-se que os produtos antimicrobianos avaliados não foram eficazes na prevenção ou redução da infiltração bacteriana da interface pilar protético e implante desde a instalação do implante até 30 dias após da instalação da prótese.

Referências Bibliográficas

- Alsahhaf A, Alrabiah M, Ali K, Vohra F, Abduljabbar T. Implant abutment disinfection using plasma of argon and 0.2% and chlorhexidine gel applications immediately before prosthesis delivery: clinical and radiographic status at 5-years of follow-up. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2023 Jan;27(1):116-121.
- Bagegni A, Zabler S, Nelson K, Rack A, Spies BC, Vach K, Kohal R. Synchrotron-based micro computed tomography investigation of the implant-abutment fatigue-induced microgap changes. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021 Apr; 116:104330.
- Bittencourt ABBC, Neto CL de MM, Penitente PA, Pellizzer EP, dos Santos DM, Goiato MC. Comparison of the Morse Cone Connection with the Internal Hexagon and External Hexagon Connections Based on Microleakage – Review. *Prague Med Rep*. 2021;122(3):181–90.
- Black DL, Turkyilmaz I, Lien W, Chong CH - Evaluation of the Sealing Capacity of Internal Conical Connections of Implants with Titanium and Zirconia Abutments. *JP-Journals out/2017;18(10):915922*.
- Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Penarrocha M, Covani U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Apr;26(4):426-434.
- Carcuac O., Abrahamsson I., Charalampakis G., Berglundh T. The effect of the local use of chlorhexidine in surgical treatment of experimental peri-implantitis in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(2):196–203.
- Caricasulo R, Malchiodi L, Ghensi P, Fantozzi G, Cucchi A. The influence of implant-abutment connection to peri-implant bone loss: A systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018 Aug;20(4):653-664.
- Cerqueira DF, Mello-Moura AC, Santos EM, Guedes-Pinto AC. Cytotoxicity, histopathological, microbiological and clinical aspects of an endodontic iodoform-based paste used in pediatric dentistry: a review. *Clin Pediatr Dent*. 2008 Winter;32(2):105-10.
- Costa MB, Ferreira LF, Takeshita WM, Marqueti AC, Trento CL. Avaliação da interface entre o componente protético reto e a conexão interna tipo Cone Morse do implante dentário por meio da microscopia eletrônica de varredura. *Rev Odontol UNESP*. 2020;49.
- Cruz M - Long-term Assay of Iodoform Pomade in the Bacterial Control of the Inner Ambient of Dental Implants: A Randomized Clinical Trial *Clin Int J Oral Science* 2002; 15 (1): 1- 13.
- Cruz G, Cruz FG, Leite FPP, Cruz M - Métodos e Procedimentos para o Controle Bacteriano no Interior dos Implantes Dentais: Revisão de Literatura- *Rev. Bras. Implant*. Abr-Jun /2011;9-12.

Cunha EJ, Auersvald CM, Deliberador TM, Gonzaga CC, Esteban Florez FL, Correr GM, Storrer CLM. Effects of Active Oxygen Toothpaste in Supragingival Biofilm Reduction: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Dent*. 2019 Jul 1; 2019:3938214.

D'Ercole S, D'Addazio G, Di Lodovico S, Traini T, Di Giulio M, Sinjari B -*Porphyromonas Gingivalis* Load is Balanced by 0.20%Chlorhexidine Gel. A Randomized, Double-Blind, Controlled, Microbiological and Immunohistochemical Human Study - *J. Clin. Com*. 2020; 9, 284.

Dias ECLCM, Sperandio M, Napimoga MH. Association Between Implant-Abutment Microgap and Implant Circularity to Bacterial Leakage: An In Vitro Study Using Tapered Connection Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 May/June;33(3):505–511.

Doyle DJ, Hendrix JM, Garmon EH. American Society of Anesthesiologists Classification. 2023 Jun 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.

Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018; 51(3):299–303.

Fernandes PF, Grenho L, Fernandes MH, Sampaio-Fernandes JC, Sousa Gomes P. Microgap and microleakage of a hybrid connection platform-switched implant system in the absence or presence of a silicone-based sealing agent. *Odontology*. 2022 Apr;110(2):231-239.

Fernandes PF, Grenho L, Fernandes MH, Sampaio-Fernandes JC, Gomes PS. Microgap and bacterial microleakage during the osseointegration period: An in vitro assessment of the cover screw and healing abutment in a platform-switched implant system. *J Prosthet Dent*. 2023 Jul;130(1):87-95.

Ferrari Jr SH, Han WH, CogoMüller K, Sendyk WR, Carvalho RDP, Kim YJ, Pallos D. Microbial accumulation around dental implants can result in stimulating damage Evaluation of the antimicrobial activity of iodoform paste on the contamination of the implant-abutment interface by *Porphyromonas gingivalis*- an in vitro study. *Journal of the International Academy of Periodontology* 2021 23(3): 308–313.

Fiorillo L Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: A Systematic Review Gels. 2019 Jun; 5(2): 31.

Forootan A, Sjöback R, Björkman J, Sjögren B, Linz L, Kubista M Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)..*Biomol Detect Quantif*. 2017; 29(12):1-6

Garrana R, Mohangi G, Malo P, Nobre M. Leakage of Microbial Endotoxin through the Implant-Abutment Interface in Oral Implants: An In Vitro Study. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:9219071.

Gehrke P, Burg S, Peters U, Beikler T, Fischer C, Rupp F, Schweizer E, Weigl P, Sader R, Smeets R, Schäfer S. Bacterial translocation and microgap formation at a novel

conical indexed implant abutment system for single crowns. *Clin Oral Investig*. 2022 Feb;26(2):1375-1389.

Greco L D A, Napimoga M H. Análise in vitro do selamento microbiológico entre componentes protéticos e implantes dentários confeccionados por manufatura aditiva [Internet]. *Revista ImplantNews*. 2022 [citado 9 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://revistaimplantnews.com.br/analise-in-vitro-do-selamento-microbiologico-entre-componentes-proteticos-e-implantes-dentarios-confeccionados-por-manufatura-aditiva/>

Han WH. Avaliação Do Efeito Antimicrobiano Do BlueM® Na Interface Pilar-Implante. (Dissertação Mestrado) Universidade De Santo Amaro- São Paulo. 2019;64.

Haydari M, Bardakci AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Preus HR. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health*. 2017 Aug 18;17(1):118.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997 Oct; 15: 55-62.

Lauritano D, Moreo G, Lucchese A, Viganoni C, Limongelli L, Carinci F. The Impact of Implant-Abutment Connection on Clinical Outcomes and Microbial Colonization: A Narrative Review. *Materials (Basel)*. 2020;13(5):1131.

Li Z, Gao S, Chen H, Ma R, Wu T, Yu H. Micromotion of implant-abutment interfaces (IAI) after loading: correlation of finite element analysis with in vitro performances. *Med Biol Eng Comput*. maio de 2019;57(5):1133–44.

Machtei EE, Romanos G, Kang P, Travan S, Schmidt S, Papathanasiou E, Tatarakis N, Tandlich M, Liberman LH, Horwitz J, Bassir SH, Myneni S, Shiao HJ, Shapira L, Donos N, Papas A, Meyle J, Giannobile WV, Papapanou PN, Kim DM. Repeated delivery of chlorhexidine chips for the treatment of peri-implantitis: A multicenter, randomized, comparative clinical trial. *J Periodontol*. 2021 Jan;92(1):11-20.

Mancini GE, Gianni AB, Cura F, Ormanier Z, Carinci F. Efficacy of a new implant-abutment connection to minimize microbial contamination: an in vitro study. *Oral Implantol (Rome)*. 2016 ;9(3):99-105.

Matsuoka T, Nakano T, Yamaguchi S, Ono S, Watanabe S, Sato T, Yatani H. Effects of Implant-Abutment Connection Type and Inter-Implant Distance on Inter-Implant Bone Stress and Microgap: Three-Dimensional Finite Element Analysis. *Materials (Basel)*. 2021 May 6;14(9):2421

Mattei BM; Imanishi SAW, Ramos GO, Campos PS, Weiss SG; Deliberado TM Mouthwash with Active Oxygen (Blue®M) Reduces Postoperative Inflammation and Pain. *Case Reports in Dentistry* 2021;(2021):1-6.

Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the Different Implant Abutment Interface: A Systematic Review. *J Clin Diagn Res*. 2017 Jun;11(6):ZE10-ZE15.

Miyahira A Avaliação do efeito do gel de Blue®M na contaminação bacteriana da interface implante/pilar protético. estudo clínico, controlado e randomizado (Dissertação de Mestrado) Universidade De Santo Amaro. São Paulo. 2022;51.

Nascimento C, Nogueira Fernandes FHC, Teixeira W, Pedrazzi V. Iodoform and silver-coated abutments preventing bacterial leakage through the implant-abutment interfaces: In vitro analysis using molecular-based method. *Arch Oral Biol.* 2019 Sep; 105:65-71.

Niveda R , Kaarthikeyan G - Effect of Oxygen Releasing Oral Gel Compared to Chlorhexidine Gel in the Treatment of Periodontitis. *Journal of Pharmaceutical Research International* 32(19): 75-82, 2020.

Ozdiler, A; Bakir-Topcuoglu,N ; Kulekci,G , Isik-Ozkol,G Effect of taper angle and sealent agentes on bacterial leakage along the implant-Abutment interface: an in vitro study under loaded conditions *Implantes Int J Oral Maxillofac* 2018 sep/out ; 33(5):1071–1077.

Pereira LM, Prudente MS, Carneiro TAPN, Penatti MPA, Davi LR, Neves FD. Avaliação da eficiência antibacteriana de géis e pomadas utilizados no interior de implantes. *Full Dent. Sci.* 2017; 8(30)1-5.

Pita MS, do Nascimento C, Dos Santos CGP, Pires IM, Pedrazzi V. Experimental conical-head abutment screws on the microbial leakage through the implant-abutment interface: an in vitro analysis using target-specific DNA probes. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Jul;28(7):e68-e75

Rismanchian M, Hatami M, Badrian H, Khalighinejad N, Goroohi H. Evaluation of microgap size and microbial leakage in the connection area of 4 abutments with Straumann (ITI) implant. *J Oral Implantol.* 2012 Dec;38(6):677-85.

Santos VCED, Maquera-Huacho PM, Imbriani MJM, Minhaco VMTR, Spolidorio DMP. Effects of BlueM® against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression. *Braz Dent J.* 2023 Jan-Feb;34(1):19-28.

Scarano, A., Valbonetti, L., Degidi, M., Pecci, R., Piattelli, A., de Oliveira, P. S., & Perrotti, V. Implant-Abutment Contact Surfaces and Microgap Measurements of Different Implant Connections Under 3-Dimensional X-Ray Microtomography. *Implant Dentistry*,2016; 25(5), 656–662.

Silva Junior JA da, Wassal T, Ramalho SA, Brito Junior RB. Aplicação da pasta de iodofórmio em implantes: avaliação da resposta tecidual na câmara interna de fixações osséointegráveis (in vivo). *RGO (Porto Alegre).* 2006;21–6.

Simionato AA , Santos ES, Faria ACL, Nascimento C, Rodrigues RCS, Ribeiro RF Bacterial Detection, Deformation, and Torque Loss on Dental Implants with Different Tapered Connections Compared with External Hexagon Connection after Thermomechanical Cycling Materials (Basel)2023 May 23;16(11):3904.

Sinjari B, D'Addazio G, De Tullio I, Traini T, Caputi S. Peri-Implant Bone Resorption during Healing Abutment Placement: The Effect of a 0.20% Chlorhexidine Gel vs. Placebo-A Randomized Double Blind Controlled Human Study. *Biomed Res Int.* 2018 Oct 16; 2018:1-13.

Smith NA, Turkyilmaz I. Evaluation of the sealing capability of implants to titanium and zirconia abutments against *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* under different screw torque values. *J Prosthet Dent.* 2014 Sep;112(3):561-7.

Smöjver I, Bjelica R, Vuletić M, Gerbl D, Budimir A, Gabrić D. Antimicrobial Efficacy and Permeability of Various Sealing Materials in Two Different Types of Implant-Abutment Connections. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 21;23(14):8031.

Vélez J, Peláez J, López-Suárez C, Agustín-Panadero R, Tobar C, Suárez MJ. Influence of Implant Connection, Abutment Design and Screw Insertion Torque on Implant-Abutment Misfit. *JCM*. 24 de julho de 2020;9(8):2365.

Vinhas AS, Aroso C, Salazar F, López-Jarana P, Ríos-Santos JV, Herrero-Climent M. Review of the Mechanical Behavior of Different Implant-Abutment Connections *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 23;17(22):8685.

Yu P, Zhi Li, Tan X, Yu H. Effect of sealing gel on the microleakage resistance and mechanical behavior during dynamic loading of 3 implant systems. *J Prosthet Dent*. 2022 Feb;127(2):308-317.

.
.

Anexo 1 – Parecer consubstanciado do CEP – Plataforma Brasil

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito antimicrobiano do BlueM® e Proheal® na interface pilar e implante

Pesquisador: Yeon Jung Kim

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57816422.4.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.385.256

Apresentação do Projeto:

Idem ao anterior

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem ao anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de anuência: Apresentada

Riscos na PB: Corrigido

Financiamento - OK

Cronograma - OK

FR assinada

TCLE - OK

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Rua Prof Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbulas

CEP: 02.450-000

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DIMINUIÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E PERDA MARGINAL ÓSSEA COM USO DO BLUEM NA INTERFACE PILAR IMPLANTE.

Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação livre e Voluntária no projeto, **DIMINUIÇÃO DA CONTAMINAÇÃO E PERDA MARGINAL ÓSSEA COM USO DO BLUEM® E PROHEAL® NA INTERFACE PILAR IMPLANTE**, do Programa de Pós-graduação (MESTRADO EM IMPLANTODONTIA) da Universidade de Santo Amaro - UNISA, que será realizado pelos pesquisadores Pedro Carvalho Feitosa, Rogério Nagai e Alexandre Miyahira como Trabalho de Conclusão de Curso, sob orientação da Prof^a. Dra. Yeon Jung Kim.

O uso de implantes dentários é uma técnica consagrada na literatura, porém, sabemos que a interface pilar e implante pode acumular culturas bacterianas e o uso de produtos como Antissépticos podem trazer benefícios, diminuindo a carga bacteriana onde for aplicado.

O presente trabalho, tem por finalidade, expandir o conhecimento e determinar técnicas para melhorar o resultado de reabilitações sobre implantes. Determinar se o uso de substâncias antissépticas como a Clorexidina 2% ,BlueM® e ProHeal® propiciam diminuição na carga bacteriana no interior de implantes, assim como diminuição da perda óssea marginal causada por inflamação devido a presença de microrganismos na região pilar implante .

Serão colocados no interior dos implantes, três substâncias já comercializadas no mercado brasileiro, com o intuito de estudar se elas diminuem a carga de bactérias na interface implante/pilar, assim como, a resposta da qualidade óssea marginal frente o uso ou não de tais substâncias. Serão realizados durante o tratamento, exames radiográficos para determinar a qualidade óssea marginal. Alguns implantes poderão não receber nenhum dos produtos, sendo considerados um grupo controle.

Após o procedimento, poderá ocorrer um desconforto pós-operatório (dor), edema (inchaço) e em alguns casos equimose (roxo), inerentes a técnica cirúrgica para o levantamento do assoalho do seio maxilar e cirurgia para instalação do implante, contudo todos os participantes da pesquisa serão assistidos pelo pesquisador em qualquer necessidade durante o pós-operatório.

Os produtos utilizados nesta técnica poderão diminuir a carga bacteriana no sitio aplicado, diminuindo a Perimplantite e a reabsorção óssea marginal, trazendo maior longevidade ao tratamento.

Após o procedimento, poderá ocorrer um desconforto pós-operatório (dor), edema (inchaço) e em alguns casos equimose (roxo), inerentes a técnica cirúrgica para instalação do implante, contudo todos os participantes da pesquisa serão assistidos pelo pesquisador em qualquer necessidade durante o pós-operatório.(DESCONFORTOS E RISCOS)

É garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para **esclarecimento de eventuais dúvidas ou informações** sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Os pesquisadores responsáveis são Pedro Carvalho Feitosa, cirurgião dentista especialista em Implantodontia, que pode ser encontrado no endereço Rua Marechal Floriano Peixoto, 1347, Duque de Caxias- Cuiaba-MT, CEP:78043-395, Tel:(65)99925-1171, Rogério Nagai, cirurgião-dentista especialista em Implantodontia, que pode ser encontrado no endereço Rua Afonso Celso , 1221 sala 43, Vila Mariana, São Paulo-SP, CEP:04104-907, Tel: (11) 5071-1544/ (11) 99726-4923 e Alexandre Miyahira , cirurgião-dentista especialista em Implantodontia, que pode ser encontrado no endereço Avenida Valentim Magalhães,122, Santo André – SP,

CEP:09120-000, TEL: (11)99154-7962. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687.

É **garantida sua liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que você tenha obtido junto à Instituição, antes, durante ou após o período deste estudo.

As informações obtidas pelos pesquisadores serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, **não sendo divulgada a identificação** de nenhum deles.

O participante da pesquisa concede a autorização para apresentar fotos e resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto

Não há **despesas pessoais** para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há **compensação financeira** relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente relacionado aos procedimentos deste estudo (nexo causal comprovado), a qualquer tempo, fica **assegurado ao participante o respeito a seus direitos legais**, bem como procurar obter **indenizações** por danos eventuais.

Uma via deste Termo de Consentimento ficará em seu poder.

São Paulo, ____/____/____

Se você concordar em participar desta pesquisa assine no espaço determinado abaixo e coloque seu nome e o nº de seu documento de identificação.

ASS: _____

Nome: (do participante)

Doc. Identificação:.....

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e

Esclarecido deste participante para a participação neste estudo, conforme preconiza a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, IV.3 a 6.

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo

Data: ____/____/____.

ASS: _____

Pesquisadores responsáveis são Pedro Carvalho Feitosa, Rua Marechal Floriano Peixoto, 1347, Duque de Caxias- Cuiabá-MT, CEP:78043-395, Tel:(65)99925-1171, Rogério Nagai Rua Afonso Celso , 1221 sala 43, Vila Mariana, São Paulo-SP, CEP:04104-907, Tel: (11) 5071-1544/ (11) 99726-4923 e Alexandre Miyahira , Avenida Valentim Magalhães,122, Santo André – SP, CEP:09120-000, TEL: (11)99154-7962

CEP-UNISA Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687