



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO PILOTO: CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DO
MICROBIOMA FORMADO EM SUPERFÍCIES MISTAS E
TOTALMENTE MAQUINADAS DE IMPLANTES DE TITÂNIO**

Trabalho submetido por
Miguel Filipe Moura Bernardo
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2019



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO PILOTO: CARACTERIZAÇÃO *IN VIVO* DO MICROBIOMA FORMADO EM SUPERFÍCIES MISTAS E TOTALMENTE MAQUINADAS DE IMPLANTES DE TITÂNIO

Trabalho submetido por
Miguel Filipe Moura Bernardo
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Mestre António José de Souza e Silva

e coorientado por
Prof. Doutor Nuno Taveira

outubro de 2019

Dedicatória

Dedico não só este trabalho, bem como todo o meu percurso académico aos meus avós, em especial ao meu avô materno António Xavier Moura. Onde quer que estejas tenho a certeza de que estás orgulhoso de mim e da pessoa que me tornei

“O sucesso consiste em ir de derrota em derrota sem nunca perder o entusiasmo”

Winston Churchill

Agradecimentos

Ao Mestre António José de Souza e Silva pela sábia orientação, ajuda na idealização e concretização deste projeto e por todo o trabalho investido.

Ao Prof. Doutor Nuno Taveira pela total disponibilidade, dedicação e empenho para que este trabalho fosse concretizado com sucesso.

À Cooperativa Egas Moniz e professores, por todo o apoio neste projeto e por ter sido a instituição que me acolheu e proporcionou 5 anos incríveis que certamente ficaram na minha memória.

Ao Prof. Doutor José Brito pelo tempo dispensado na análise estatística e interpretação dos dados.

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, CEMUP e I3S, na pessoa do Prof. Doutor José Santos, por toda a ajuda na obtenção dos dados.

Aos meus pais, pela sua educação de excelência, apoio incondicional, e por me estimularem a ser melhor todos os dias. A sua dedicação em tudo o que fazem foi o guia para cumprir os objetivos a me que proponho diariamente. À minha irmã, pela compreensão, compaixão e sentido de humor que fazem os meus dias melhores.

À minha namorada Margarida Furtado por me compreender melhor que ninguém, pela total disponibilidade, paciência e por me nunca me deixar desistir perante as dificuldades. Foi a sua presença constante que me fez converter dificuldades em forças para continuar. Este projeto também é teu.

Ao Revis e ao Gonçalo por serem os meus irmãos durante estes 5 anos. O vosso aparecimento durante a minha vida académica faz-me ter a certeza de que há amizades que são para a vida. Um obrigado não chega para descrever a vossa presença.

À minha colega de box Inês Leitão por estes 5 anos de curso e pelos 2 anos de clínica ao teu lado. Por colmatares as minhas falhas e por me fazeres melhor profissional todos os dias. A amizade que tenho por ti não caberia neste papel. Trabalhar no que se gosta é bom, mas trabalhar com quem se gosta é inexplicável. Box 2 para sempre.

À AAIUEM por ter sido a minha segunda casa e por me permitir crescer com indivíduo e como profissional. Ao Conselho de Praxe por serem os meus irmãos de capa e por me ensinarem o verdadeiro valor das palavras “compromisso” e “lealdade”. Levo-vos para a vida.

Ao Departamento de Periodontologia do IUEM por me ter acolhido na sua incrível equipa e por me fazer apaixonar cada dia que passa por esta área. Ao Departamento de Microbiologia e APL pela ajuda no decorrer deste trabalho.

A todos os voluntários, protésicos e técnicas de laboratório que contribuíram para a realização deste projeto.

À Mariana por ter sido a minha ouvinte e por me ajudar nos tempos de maior aperto.

Resumo

Introdução: A grande maioria das infecções associadas aos implantes dentários resultam da adesão de bactérias à superfície dos biomateriais e subsequente formação de biofilme. A peri-implantite resulta de um processo que compreende interações bacterianas e uma resposta inflamatória excessiva do hospedeiro. O propósito das modificações da superfície implantar é afetar positivamente a resposta dos tecidos à colocação do implante, nomeadamente reduzindo a adesão bacteriana e aumentando a osteointegração.

Objetivos: Caracterizar o microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio presentes na cavidade oral de voluntários humanos durante 48h, e investigar o impacto dos microrganismos na estrutura dos implantes.

Materiais e métodos: Vinte e dois voluntários usaram dispositivos intra-orais contendo, em cada lado, um implante de titânio maquinado e um implante com tratamento de superfície Vellox® (duplo condicionamento ácido + jateamento com óxido de alumínio) por um período de 48h. Após este período os implantes foram recolhidos e o microbioma bacteriano aderido foi caracterizado quanto à sua composição e diversidade com recurso à sequenciação dos genes da porção 16S do ARN ribossomal. Adicionalmente, os implantes estudados foram observados com recurso ao MEV e a sua molhabilidade superficial foi obtida por mediação do ângulo de contacto.

Resultados: A superfície Vellox® ($135,6^\circ \pm 2,8$) apresentou um ângulo de contacto superior à superfície maquinada ($102,6 \pm 0,4$) sendo ambas caracterizadas como hidrofóbicas. Ao contrário da superfície maquinada que apresenta, a nível microscópico uma superfície plana e regular, a superfície Vellox® apresenta uma superfície irregular com cavidades de dimensão e disposição variáveis. Comparando a adesão bacteriana das duas superfícies verifica-se que esta ocorre de maneira semelhante em ambas as superfícies estando esta representada na ausência de diferença estatisticamente significativa na beta diversidade.

Conclusão: A molhabilidade e a características microtopográficas da superfície implantar não promovem a adesão do biofilme inicial às superfícies com diferentes tratamentos de superfície.

Palavras-chave: Adesão bacteriana; Titânio; Implante; Superfície implantar; Molhabilidade; Propriedades de superfície

Abstract

Introduction: The vast majority of dental implant-related infections result from bacteria adhering to the surface of biomaterials and subsequent biofilm formation. Peri-implantitis results from a process comprising bacterial interactions and an excessive inflammatory response of the host. The purpose of changes in the implanted surface is to positively alter tissue response to implant placement, including bacterial adhesion and osteointegration.

Objectives: To characterize the microbiome formed on machined surfaces of titanium implants present in the human oral cavity for 48h, and investigate the impact of microorganisms on the implant structure.

Materials and methods: Twenty-two volunteers used intraoral devices on each side, a machined titanium implant and a Vellox® surface treatment (dual acid etching + blasting whit aluminium oxide) implant for a period of 48h. After this period, the implants were collected and the attached bacterial microbiome was used for its composition and diversity using the sequencing of the 16S section genes of ribosomal RNA. Additionally, the studied implants were observed using SEM and their surface moisture was applied by contact angle measurement.

Results: The Vellox® surface ($135.6^\circ \pm 2.8$) presented a contact angle higher than the machined surface (102.6 ± 0.4) and the characteristics were characterized as hydrophobic. Unlike its machined surface, which has a flat and regular microscopic surface level, a Vellox® surface has an uneven surface with display cavities and surface variations. Comparing bacterial adhesion of two verified surfaces, which occurs similarly on surfaces such as surfaces that are represented in the absence of a statistically significant difference in beta diversity.

Conclusion: Hydration and microtopographic characteristics of the implanted surface do not promote adhesion of the initial biofilm to surfaces with different surface depths.

Key words: Bacteria adhesion; Titanium; Implant; Implant surface; wettability; surface properties

Índice Geral

I. Introdução	15
1. Implantologia dentária	18
1.1 História da Implantologia	18
1.2 Osteointegração e o seu papel no sucesso clínico dos implantes.....	18
2. Superfícies implantares	20
2.1 Topografia	21
2.2 Molhabilidade e Energia de superfície	21
2.2.1 Molhabilidade e interação com o sangue	21
2.2.2 Molhabilidade e a adesão bacteriana	22
2.2.3 Molhabilidade e o seu papel na osteointegração	22
2.2.4 Obtenção dos valores de molhabilidade das superfícies implantares	23
2.3 Rugosidade da superfície implantar	23
2.3.1 Medição da rugosidade das superfícies implantares.....	23
2.3.2 Relação da rugosidade com o carácter hidrofóbico e hidrofilico	24
2.4 Tratamentos de superfície em implantes de titânio	24
2.4.1 Superfícies maquinadas	24
2.4.2 Superfícies macrotextrizadas	25
2.4.3 Superfícies microtexturizadas	25
2.4.4 Superfícies nanotextrizadas	26
3. Doença Peri-implantar	27
3.1 Definições	28
3.1.1 Saúde peri-implantar	28
3.1.2 Mucosite peri-implantar	28
3.1.3 Peri-implantite	28
3.2 Etiologia da peri-implantite	28
3.3 Prevalência e incidência da peri-implantite	29
3.4 Microbiologia da peri-implantite	29
3.5 Relação entre a peri-implantite e os tratamentos de superfície.....	31
4. Microbioma oral	31
4.1 Constituintes do microbioma oral	32

4.2 Adesão bacteriana e a formação do biofilme em superfícies de implantes de titânio	33
II. OBJETIVOS DO ESTUDO	37
III. HIPÓTESES DO ESTUDO	37
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. Tipo de estudo	39
2. Considerações éticas	39
3. Local de realização do estudo	39
4. Amostra estudada	39
4.1 Critérios de inclusão	40
4.2 Critérios de exclusão	40
5. Materiais	40
6. Superfícies implantares analisadas	42
6.1 Superfície Maquinada	42
6.2 Superfície Vellox®	42
7. Métodos	43
7.1 Observação clínica e colheita de dados	43
7.2 Produção do dispositivo intra-oral	44
7.3 Preparação e introdução das amostras no dispositivo	46
7.4 Colocação dos dispositivos na cavidade oral dos voluntários	47
7.5 Análise microbiológica	49
7.5.1 Controlos de adesão bacteriana	49
7.5.2 Remoção dos microorganismos para análise genómica	49
7.5.3 Caracterização do microbioma	50
8. Avaliação da molhabilidade das superfícies implantares estudadas	51
9. Análise microscópica	52
10. Análise estatística	54
V. RESULTADOS	57
1. Caracterização dos participantes no estudo	57
2. Molhabilidade superficial	57
3. Análise microscópica	57
3.1 Implantes sem contaminação	57
3.1.1 Composição elementar da superfície implantar	59
3.2 Análise dos implantes contaminados <i>in vivo</i> sem protocolo de remoção ...	61

3.3	Análise dos implantes contaminados <i>in vivo</i> com protocolo de remoção ..	63
4.	Análise microbiológica	66
4.1	Análise dos implantes de controlo de adesão bacteriana (contaminados <i>in vitro</i>)	66
4.2	Análise dos implantes sujeitos à cavidade oral	66
4.2.1	Contagem das leituras	66
4.2.2	Classificação taxonómica das sequências obtidas	67
4.2.3	Proporções bacterianas	70
4.2.3.1	Proporções de <i>Enterococcus não classificados</i> e <i>Escherichia coli</i>	70
4.2.3.2	Proporções de <i>Fusobacterium não classificada</i> e <i>Porphyromonas não classificada</i>	70
4.2.3.3	Proporções <i>Actinomyces não classificada</i> e <i>Prevotella melaninogenica</i>	71
4.2.3.4	Proporções de <i>Prevotella nanceiensis</i> e <i>Prevotella não classificada</i>	72
4.2.3.5	Proporções <i>Rothia dentocariosa</i> e <i>Rothia mucilaginosa</i>	72
4.2.3.6	Proporções <i>Streptococcus infantis</i> e <i>Streptococcus não classificados</i>	73
4.2.3.7	Restantes proporções bacterianas.....	73
5.	Análise estatística	73
5.1	Análise estatística dos valores da molhabilidade da superfície implantar	73
5.2	Análise estatística dos valores microbianos nos implantes contaminados <i>in vivo</i>	74
5.2.1	Alfa Diversidade e nº de leituras	75
5.2.2	Diversidade Beta e teste de abundância diferencial	76
5.2.2.1	Teste de abundância diferencial	78
5.2.3	Análise das proporções bacterianas	78
VI.	DISCUSSÃO.....	79
VII.	CONCLUSÃO	87
VIII.	BIBLIOGRAFIA	89
IX.	ANEXOS	

Índice de Figuras

Figura 1 - Comparação entre superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas na presença de sangue.....	22
Figura 2 - Complexo de Sockraanski.....	30
Figura 3 - Especificidade do microbioma oral em diferentes zonas.....	32
Figura 4 - Representação esquemática da formação e co-agregação de biofilme multi-espécie.....	34
Figura 5 - Processo de formação do biofilme em superfícies de titânio e estratégias de redução da adesão bacteriana.....	36
Figura 6 - Cronograma das fases metodológicas do projeto de investigação.....	43
Figura 7 - Dispositivo intra-oral após confeção.....	46
Figura 8 - Colocação dos implantes em estudo no dispositivo intra-oral.....	47
Figura 9 - Dispositivo intra-oral colocado em boca	48
Figura 10 - Processo de deposição da gota séssil sobre a superfície implantar com superfície maquinada	52
Figura 11 - Imagem da câmara ótica para medição do ângulo de contacto na superfície Vellox®	57
Figura 12 - Imagem da câmara ótica para medição do ângulo de contacto na superfície maquinada	57
Figura 13 - Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com aplicação 50x.....	58
Figura 14 - Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com ampliação 250x.....	58
Figura 15 - Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com aplicação 2000x	58
Figura 16 - Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com aplicação 10000x	59

Figura 17 - Resultados da espectroscopia de raios X por dispersão de energia de implantes Vellox® sem contaminação.....	60
Figura 18 - Resultados da espectroscopia de raios X por dispersão de energia de implante maquinado sem contaminação.....	60
Figura 19 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 50x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha).....	61
Figura 20 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 50x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha).....	61
Figura 21 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 250x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha)	62
Figura 22 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 2000x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha)	62
Figura 23 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 10000x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha)	63
Figura 24 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 50x da superfície Vellox® e maquinada (com contaminação+ protocolo de remoção)	64
Figura 25 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 2000x da superfície Vellox® (com contaminação Vs sem contaminação)	64
Figura 26 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 10000x da superfície Vellox® (com contaminação Vs sem contaminação)	64
Figura 27 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 2000x da superfície maquinada (com contaminação Vs sem contaminação)	65
Figura 28 - Imagem obtida pela observação com o MEV com aplicação 10000x da superfície maquinada (com contaminação Vs sem contaminação)	65
Figura 29 - Imagem obtida pela observação com o MEV dos implantes de controlo de adesão bacteriana	66
Figura 30 -Taxa de agregação em cada ranking taxonómico.....	68

Figura 31 – Taxa de agregação por espécie	69
Figura 32 - Boxplot para comparação dos diferentes índices de diversidade de Shannon de cada amostra.....	74
Figura 33 - Gráfico do princípio análise das coordenadas da composição microbiana de todas as amostras	77

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tabela de leituras por superfície em cada	67
Tabela 2 - Espécies bacterianas identificadas pela análise microbiológica dos implantes estudados	69
Tabela 3 - Proporções de Enterococcus não classificados	70
Tabela 4 - Proporções de Escherichia coli não classificadas	70
Tabela 5 - Proporções de Fusobacterium não classificada	71
Tabela 6 - Proporções de Porphyromonas não classificada	71
Tabela 7 - Proporções Actinomyces não classificada	71
Tabela 8 - Prevotella melaninogenica	71
Tabela 9 - Proporções Prevotella nanceiensis	72
Tabela 10 - Proporções Prevotella não classificada	72
Tabela 11 - Proporções Rothia dentocariosa	72
Tabela 12 - Proporções Rothia mucilaginosa	72
Tabela 13 - Proporções Streptococcus infantis.....	73
Tabela 14 - Proporções Streptococcus não classificados	73
Tabela 15 - Valores do índice de diversidade de Shannon em cada amostra emparelhado por indivíduo	75
Tabela 16 - Estatística descritiva para as variáveis "nº de leituras" e "Índice de Diversidade de Shannon" em cada superfície	75
Tabela 17 - Resultados do teste t para amostras emparelhadas	76
Tabela 18 - Tabela descritiva dos resultados obtidos no teste de Adonis (Permanova)	78

Lista de abreviaturas

Organização Mundial de Saúde (**OMS**)

Sandblasted Acid Etching (Jateamento com partículas cerâmicas e condicionamento ácido) (**SLA**)

Microscópio Eletrônico de Varrimento (**MEV**)

Reação de Polimerização em Cadeia (**PCR**)

Ácido Desoxirribonucleico (**ADN**)

Ácido Ribonucleico (**ARN**)

Unidade Taxonómicas Organizacionais (**OTU**)

Princípio da Análise de Coordenadas Principais (**PCoA**)

Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (**EDS**)

Moles (**M**)

Porcentagem (**%**)

Microlitro (**µl**)

Mililitro (**ml**)

Rotações por minuto (**rpm**)

I. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS,2015), desde do século passado que se assiste a um envelhecimento da população. Estudos epidemiológicos apontam que 11% da população mundial encontra-se com idade superior a 60 anos, estando projetado que esta percentagem aumente para os 22% no ano de 2050. Consequentemente, o número de pacientes que necessitam de reabilitações de espaços edêntulos, e apesar do nível preventivo no qual a Medicina Dentária atual se foca, também aumentará (Marotti et al., 2018).

A causa mais comum de perdas dentárias é a periodontite, sendo outras causas como a cárie dentária, o trauma, os defeitos de crescimento e desordens genéticas apontadas como causas frequentes (Hong & Oh, 2017). O uso de implantes dentários para reabilitar dentes perdidos tem aumentado nos últimos 30 anos (Jenny et al, 2016). São várias as soluções protéticas existentes para solucionar espaços edêntulos, abrangendo as próteses dentárias removíveis, as próteses parciais fixas e as sobredentaduras (Marotti et al., 2018). No entanto, os implantes dentários tem-se tornado a solução mais popular devido à sua elevada taxa de sucesso, previsibilidade e baixa percentagem de complicações. Estes permitem restabelecer a função mastigatória, bem como a função estética (Shemtov-Yona & Rittel, 2015). Atualmente, a taxa de sucesso dos implantes encontra-se entre os 60-80% (Ferenc, 2019).

Segundo Branemark (1983), a osteointegração em Medicina Dentária, depende do entendimento das capacidades curativas e regenerativas dos tecidos moles e duros (P. I. Branemark, 1983). No entanto, para além dos conceitos referidos anteriormente, o design do implante e o tratamento de superfície são duas características fundamentais para a manipulação da osteointegração (Wirth et al., 2017).

Presentemente, o titânio é considerado o *gold standard* dos constituintes dos implantes dentários, sendo que a longo prazo é o que apresenta melhores resultados. (F. Rupp, Liang, Geis-Gerstorfer, Scheideler, & Hüttig, 2018).

Comercialmente o titânio apresenta vários graus de pureza variando de um a quatro, dependendo da sua composição química e presença de outros elementos tais como o ferro, carbono e oxigénio. Existe ainda um titânio de grau cinco cuja fórmula química é Ti-6Al-4V e apresenta, para além do titânio, 6% de alumínio e 4% de vanádio. Desta forma é possível obter melhores propriedades mecânicas e maior resistência à fadiga (Annunziata & Guida, 2015).

No entanto o constituinte do implante apenas representa umas das seis características fundamentais para o sucesso clínico do implante entre as quais se encontram o tratamento de superfície, o desenho, a qualidade do osso onde é introduzido, as cargas que este sofre durante a reabilitação e a técnica cirúrgica usada para a sua colocação (F. Rupp et al., 2018).

Atualmente, torna-se cada vez mais claro que as características da superfície de um biomaterial, como é o caso dos implantes dentários em titânio, desempenham um papel fundamental na rapidez da osteointegração (Bosshardt, Chappuis, & Buser, 2017).

A geometria macroscópica do implante avalia os diferentes formatos dos implantes dentários. A geometria primária avalia a presença ou ausência de espiras que têm como função distribuir as forças mastigatórias e garantir a estabilidade primária no período pós cirúrgico imediato. A geometria secundária, também designada geometria de superfície avalia o potencial de osteointegração. Atualmente é possível distinguir dois grandes métodos de tratar a superfície implantar: técnicas aditivas e subtrativas (Cervino et al., 2019)

A primeira e, a mais válida estratégia, adotada para aumentar o interface osso-superfície implantar é através da modificação da topografia da superfície, aumentando a sua macro, micro e nanorugosidade. (Annunziata & Guida, 2015). Estas modificações na superfície implantar permite também aumentar a energia de superfície e a molhabilidade (Ionescu et al., 2018).

A cascata biológica de eventos que ocorrem no interface biomaterial/ hospedeiro depende significativamente da molhabilidade da superfície do biomaterial que constitui o implante dentário (Frank Rupp et al., 2014).

O conceito de sucesso implantar estende-se para além da sobrevivência do implante. Além da falta de mobilidade do implante, este conceito abrange também a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares. A peri-implantite é uma doença complexa com múltiplos fatores causais. No entanto, é amplamente aceite que o seu início resulta de um processo que compreende interações bacterianas e uma resposta inflamatória excessiva do hospedeiro. Nos dias de hoje ainda não é consensual quais as bactérias que desencadeiam a peri-implantite e consequente perda de osso peri-implantar (D. M. Daubert & Weinstein, 2019).

O microbioma em implantes com peri-implantite tem sido descrito como semelhante ao encontrado em pacientes com periodontite crónica (D. M. Daubert & Weinstein, 2019).

Porphyromonas gingivalis, *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *S. intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Tannerella forsythia*, e *Tannerella socranskii* desempenham um papel relevante na origem da inflação tecidual e consequente perda de tecido ósseo peri-implantar (D. M. Daubert & Weinstein, 2019).

Hemorragia à sondagem e sinais clínicos de inflamação são características da mucosite peri-implantar, sendo que esta difere da peri-implantite por não existir perda óssea. A peri-implantite, ocorre por deposição de placa bacteriana nos tecidos peri-implantares que leva à inflamação crónica e perda óssea progressiva. Desta forma pode afirmar-se que a mucosite peri-implantar precede da peri-implantite (G. Caton et al., 2018).

A hidrofília e rugosidade de superfície dos implantes, desempenham um papel relevante na promoção *in vivo* da adesão e colonização bacteriana da superfície implantar. No entanto, estas também são fundamentais para o processo de osteointegração, pelo que reduzir tais parâmetros pode comprometer o processo osteointegrativo. (Ionescu et al., 2018).

A grande maioria das infeções associadas aos implantes dentários resultam da adesão de bactérias à superfície dos biomateriais e subsequente formação de biofilme que depende de propriedades químicas e físicas do biomaterial (Ploux, Ponche, & Anselme, 2010).

Para que seja possível o desenvolvimento de um implante que, simultaneamente, possua elevado grau de osteointegração e inibição da colonização bacteriana, é fundamental conhecer as interações celulares com as superfícies implantares a num nível nanométrico (Kirmanidou et al., 2016).

1. Implantologia Dentária

1.1 História da Implantologia

O uso de substitutos de peças dentárias remonta desde das civilizações egípcia e sul americana. Nestas, os implantes eram colocados no período *posmortem* ou durante a vida do indivíduo, sendo obtidos maioritariamente de dentes de animais ou marfim. Na Europa do século XVII a utilização de materiais de origem animal como substitutos dentários era uma prática muito utilizada. No século seguinte, a origem dos implantes dentários colocados na altura passou a ser de dadores que vendiam os seus dentes com esse propósito. Em 1913, Greenfield desenvolveu um implante endo-ósseo “basket-style” constituído por irídio e ouro. Com recurso a brocas cirúrgicas, o osso receptor era preparado e posteriormente colocado nele o implante. Após este procedimento era colocada uma coroa. Este tipo de reabilitação apenas serviria para reabilitar perdas unitárias de dentes na arcada dentária. Em 1983, o médico ortopedista e professor universitário Per-Ingvar Branemark apresenta o conceito de osteointegração. Per-Ingvar Branemark constatou que dispositivos de titânio inseridos nas tíbias de coelho não se moviam devido à formação de tecido ósseo em redor do dispositivo que promovia a sua ancoragem ao osso. Os conceitos apresentados por Branemark são até hoje usados com base teórica na implantologia contemporânea (Block, 2018).

1.2 Osteointegração e o seu papel no sucesso clínico

Branemark definiu osteointegração como sendo a “Uma ligação direta entre o osso vivo ordenado e um implante endo-ósseo de transporte de carga” (P.-I. Branemark, Chien, Grondahl, & Robinson, 2006)

A osteointegração é um processo dinâmico durante o qual a estabilidade primária de um implante é convertida em estabilidade secundária. A estabilidade primária de um implante é conferida pela fixação mecânica do mesmo imediatamente após a sua colocação no osso (por exemplo, o contacto direto entre a superfície das paredes ósseas do leito implantar e a superfície do implante). A fixação secundária de um implante é obtida com a formação do novo osso em redor do implante, ou seja, após o processo de osteointegração. Este processo de fixação envolve uma cascata de eventos biológicos celulares e extracelulares e baseia-se no princípio de regeneração óssea e osteocondução

do biomaterial constituinte do implante. A perfuração do osso para obter o leito implantar origina uma lesão hemorrágica que inicia a cascata de processo de reparação-regeneração. A reparação da lesão e a regeneração tecidual é um processo mediado por vários tipos celulares que comunicam entre si. A colocação de um biomaterial interfere com o processo de reparação da lesão e influencia a aposição de novo tecido ósseo no mesmo. (Bosshardt et al., 2017)

Se a reparação da lesão decorrer sem complicações, o processo de osteointegração pode ser resumido nas seguintes etapas: (I) Hemóstase e formação do coágulo; (II) Formação de tecido de granulação; (III) Formação de tecido ósseo; (IV) Remodelação óssea. (Bosshardt et al., 2017)

Após o surgimento da lesão hemorrágica, o primeiro componente biológico em contacto com o implante é o sangue. Neste podemos encontrar, para além de eritrócitos e plaquetas, células inflamatórias tais como neutrófilos polimorfonucleares e monócitos que migram dos capilares para o tecido em redor do implante. Estas células sanguíneas presentes no interface osso-implante são ativadas libertando citocinas (por exemplo Interleucina 1- β) e fatores de crescimento (por exemplo o Fator de Necrose Tumoral β). O interface inicial das plaquetas com a superfície implantar originam a formação de um coágulo. Neste processo, as plaquetas passam por um conjunto de alterações morfológicas que incluem a sua adesão, dispersão e agregação, bem como alterações bioquímicas resultando na indução da fosfotirosina, aumento do cálcio intracelular e hidrólise dos fosfolípidos. Como resultado deste processo forma-se uma matriz de fibrina que serve como “rede” (osteocondutora) para a migração, e eventual diferenciação (osteoadutora) de células osteogénicas. (Mavrogenis, Dimitriou, Parvizi, & Babis, 2009)

A formação de osso inicia-se durante a primeira semana após o momento da implantação. Os osteoclastos e as células mesenquimatosas migram para junto da superfície implantar após 24 horas do momento de implantação, depositando proteínas osso-relacionadas e originando uma matriz não-colagénica na superfície implantar. Esta matriz regula a adesão celular e a adesão de minerais (Bosshardt et al., 2017).

O osso inicial é constituído por tecido ósseo que emerge da superfície do leito implantar preparado formando estruturas trabeculares conectando o osso original (osso previamente presente nas paredes do leito implantar) com a superfície implantar. (Bosshardt et al., 2017)

Quando o tecido ósseo trabeculado recém-formado atinge uma dimensão considerável, origina-se a deposição de osso lamelar, aumentando assim a densidade

óssea até os primeiros osteões (sistema de Harvards) estarem estabelecidos. (Bosshardt et al., 2017)

O osso original permanece em contacto com a superfície implantar durante 1 a 2 semanas até este necessitar de ser reabsorvido. A reabsorção inibe a formação do novo osso, que só retoma até que todo o osso original seja reabsorvido. Este processo demora, em média 2 semanas. Findo este processo, a remodelação óssea continua para o resto da vida (Bosshardt et al., 2017).

Dependendo da localização anatômica e de fatores específicos do paciente, algumas secções da superfície implantar encontra-se coberta com osso trabecular, enquanto outra apresentam-se revestidas de osso cortical (Bosshardt et al., 2017).

De um modo geral, a osteointegração saudável do implante dentário é uma condição obrigatória para o seu sucesso clínico e depende não só das características químicas e físicas bem como das características mecânicas, topográficas e tridimensionais do implante (Ogle, 2015).

É de notar que a osteointegração só por si não está diretamente relacionada com nenhuma superfície implantar pois este processo ocorre em todas as superfícies implantares. No entanto as características de superfície implantar correlacionam-se com a magnitude da resposta óssea ao implante - forte ou fraca (Ogle, 2015).

2. Superfícies implantares

O papel das características das superfícies implantares no sucesso clínico dos implantes tornou-se cada vez mais óbvio desde anos 80, data em que os requisitos necessários para garantir uma duradoura e direta relação osso-implante começaram a ser recolhidos, sendo estes o material do implante, estado do osso, técnica cirúrgica, carga ao qual o implante está sujeito e o tratamento da superfície (F. Rupp et al., 2018).

O propósito das modificações da superfície implantar é afetar positivamente a resposta dos tecidos à colocação do implante. As modificações das superfícies implantares podem ser obtidas através de dois processos distintos: aditivos e subtrativos. Os métodos subtrativos removem material da superfície implantar enquanto os métodos aditivos adicionam material, ou materiais, à superfície implantar (De Bruyn et al., 2017).

São diversas as propriedades físicas e mecânicas cujo papel é fundamental conhecer para a correta integração do implante dentário. As mais relevantes são:

topografia, molhabilidade, energia de superfície, composição física e composição química (Wennerberg, Albrektsson, Andersson, & Krol, 1995).

2.1 Topografia

A topografia de uma superfície implantar avalia as características macro e microscópicas das mesmas (Gupta, Dahiya, & Shukla, 2014).

A modificação da topografia de superfície através do aumento da macro, micro e nano rugosidade é a primeira e a mais válida estratégia adotada para aumentar o interface osso-implante. O princípio desta abordagem é maioritariamente biomecânico uma vez que uma superfície mais rugosa apresenta maior área de contacto comparada com uma superfície mais lisa. Desta forma existe maior interface entre o osso e o implante (Annunziata & Guida, 2015).

2.2 Molhabilidade e Energia de Superfície

A hidrofobicidade e/ou hidrofília (molhabilidade) de uma superfície implantar é de elevado interesse no processo de osteointegração. Esta é expressa pelo ângulo de contacto da água sobre a superfície. Este valor oscila entre 0° em superfícies muito hidrofílicas e maior que 90° em superfícies muito hidrofóbicas (Almas, Smith, & Kutkut, 2019).

Os valores de molhabilidade têm influência direta da energia livre de superfície, definida com a interação entre as forças de adesão e as forças de coesão, ou seja, a distribuição do líquido sobre a superfície do implante. Este valor é afetado pela composição química, carga e da topografia microestrutural da superfície implantar. Maior valor de energia de superfície implica menor ângulo de contacto e maior molhabilidade. Analogamente, menor valor de energia de superfície implica maior ângulo de contacto e menor molhabilidade. (Almas et al., 2019).

2.2.1 Molhabilidade e interação com o sangue

A hidrofília influencia a adesão seletiva de proteínas sanguíneas e a sua composição, força de ligação, conformação e orientação. Desta forma uma elevada

hidrofilia das superfícies implantares conduz à adesão das plaquetas, ativação dos trombócitos e conseqüente formação do coágulo (Figura 1) (Almas et al., 2019).

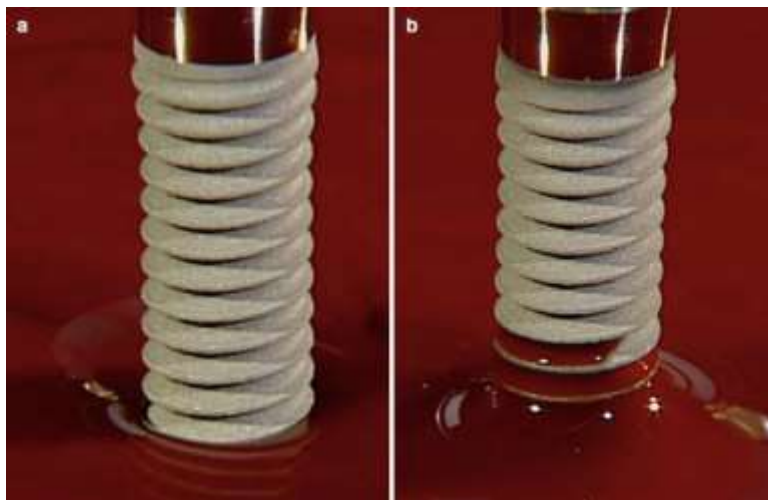


Figura 1-Comparação entre superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas na presença de sangue. (a) Superfície hidrofóbica com baixa energia de superfície e molhabilidade; (b) Superfície hidrofílica com alta energia de superfície e molhabilidade. [Adaptada e devidamente autorizada por Wennerberg, Albrektsson, & Jimbo (2015)]

2.2.2 Molhabilidade e a adesão bacteriana

A hidrofilia das superfícies implantares tem sido apontada como promotora para a adesão inicial do biofilme enquanto que superfícies hidrofóbicas demonstraram possuir uma maior adesão bacteriana. Tal facto acontece através das interações entre a superfícies hidrofóbicas dos implantes e as propriedades hidrofóbicas dos componentes que constituem as membranas celulares, bem como as adesinas localizadas nas fimbrias ou nos pilis. No entanto, apesar da elevada hidrofilia das superfícies implantares, a topografia da superfície continua a ser apontada como tendo papel mais determinante na adesão bacteriana (Almas et al., 2019).

2.2.3 Molhabilidade e o seu papel na osteointegração

A molhabilidade apresenta um papel relevante na promoção da formação óssea imediata ao potenciar a diferenciação osteoblástica nas fases iniciais do processo osteointegrativo. Superfícies hidrofílicas apresentam melhor contributo para a osteointegração que superfícies hidrofóbicas (Almas et al., 2019).

2.2.4 Obtenção dos valores de molhabilidade das superfícies implantares

Para obter os valores de molhabilidade, a técnica comumente utilizada é a do ângulo de contacto. Esta permite analisar a camada mais extrínseca dos átomos estendendo-se a 1 nm de profundidade. Para esta medição utiliza-se uma gota séssil, frequentemente de água. Com esta abordagem é possível obter ótimos resultados aquando da análise de superfícies planas e de tamanho considerável. No entanto, os implantes apresentam superfícies implantares irregulares, de pequenas dimensões e com espiras causando a interposição da gota (F. Rupp et al., 2018).

2.3 Rugosidade da superfície implantar

A rugosidade da superfície implantar é comumente descrita utilizando a nomenclatura Ra, no caso de ser um parâmetro bidimensional, ou Sa no caso de corresponder a um parâmetro tridimensional (englobando a altura das estruturas da superfície). As superfícies implantares são classificadas em quatro grupos distintos consoante o valor da rugosidade tridimensional (Sa): implantes lisos apresentam valores de Sa inferiores a 0,5 μm ; implantes minimamente rugosos apresentam valores de Sa entre 0,5 μm e 1 μm ; implantes moderadamente rugosos exibem valores de Sa entre 1 μm e 2 μm ; implantes com superfície rugosa exibem valores de Sa superiores a 2 μm (De Bruyn et al., 2017).

É possível correlacionar a rugosidade da superfície implantar e a resposta óssea com a qualidade mecânica do interface osso-implante (Almas et al., 2019).

A rugosidade da superfície é um fator chave no processo de osteointegração, verificando-se um aumento da atividade osteoblástica em superfícies rugosas (valor de Sa varia entre o 1 μm e 100 μm) comparativamente a superfícies lisas (Hong & Oh, 2017).

2.3.1 Medição da rugosidade das superfícies implantares

Ao contrário de superfícies planas onde é relativamente fácil a sua análise topográfica, os implantes apresentam uma topografia complexa devido à sua curvatura, espiras e degraus. Estas características topográficas da superfície dificultam a medição

pois são áreas irregulares, de pequenas dimensões e inacessíveis. A perfilometria, interferometria, microscopia eletrónica de varrimento e a microscopia confocal a laser são alguns meios de análise da microtopografia utilizados atualmente (F. Rupp et al., 2018)

Atualmente os valores de S_a é a unidade mais fiável no que concerne à avaliação da rugosidade dos implantes (F. Rupp et al., 2018).

2.3.2 Relação da rugosidade e o carácter hidrofóbico e hidrofílico

É possível relacionar o carácter hidrofóbico e hidrofílico de uma superfície implantar com a sua rugosidade através do ângulo de contacto. Uma superfície hidrofílica quando sujeita a um aumento de rugosidade torna-se numa superfície ainda mais hidrofílica. Por sua vez, o mesmo se constata com uma superfície de carácter hidrofóbico, onde um aumento de rugosidade promove um aumento deste mesmo carácter hidrofóbico. (F. Rupp et al., 2018).

2.4 Tratamentos de superfície em implantes de titânio

2.4.1 Superfícies maquinadas

Originalmente os implantes apresentavam uma superfície lisa. Estes eram designados com implantes maquinados pois apenas era conferida a macro topografia através da introdução de espiras. Após o seu processamento, estes eram limpos, descontaminados e esterilizados (Abraham, 2014).

Microscopicamente é possível visualizar na superfície destes implantes as marcas dos instrumentos utilizados aquando da sua preparação (Abraham, 2014).

A existência destas imperfeições na superfície permite um interface direto entre o osso e o implante. No entanto estes implantes apresentam como desvantagem a proliferação das células osteogénicas ao longo dos sulcos na superfícies tornando o período de osteointegração mais longo (Abraham, 2014).

Atualmente, uma vez que foram as primeiras disponibilizadas no mercado e devido à sua baixa rugosidade, as superfícies maquinadas são usadas como grupo de controlo nas diversas investigações na área da implantologia (Annunziata e Guida, 2015).

2.4.2 Superfícies Macrotextrizadas

É possível obter superfícies com macrotextura utilizando processos de adição e subtração. As técnicas, mais frequentes para adquirir superfícies com esta textura são aditivas e consistem em: spray de plasma de titânio ou SPT (pulverização de partículas de titânio) e spray de plasma de hidroxiapatite ou SPH (pulverização com fosfato de cálcio) (Le Guéhenec, Soueidan, Layrolle, & Amouriq, 2007).

No primeiro caso, as partículas de titânio são projetadas contra a superfície do implante a altas temperaturas. Devido a estas temperaturas, as partículas fundem-se originando assim uma camada uniforme aumentando a área de superfície (De Bruyn et al., 2017). Esta camada apresenta uma espessura de 40-50 μm e uma rugosidade média de 7 μm (Le Guéhenec et al., 2007).

No segundo caso as partículas cerâmicas são projetadas a altas temperaturas contra a superfície do titânio. Para que exista retenção mecânica das partículas, a superfície deve ser previamente tratada para aumentar a sua rugosidade. A espessura da camada obtida na superfície do titânio deve ser na ordem dos micrómetros ou, por vezes, dos milímetros. Por sua vez, devido à elevada espessura e porosidade desta camada, é possível a existência de uma separação da mesma da superfície do implante, consequente libertação de partículas residuais e alterações na composição química e estrutura cristalina do fosfato de cálcio (Annunziata & Guida, 2015).

2.4.3 Superfícies microtexturizadas

A forma mais comum para obter superfícies microtexturizadas é através de um método de subtração, o condicionamento ácido. Este pode ser complementado com o jateamento de partículas num método que combina a subtração com a adição.

A aplicação de ácido em superfícies metálicas permite modificações na sua rugosidade. Ácidos fortes como o ácido fluorídrico (HF), ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico e a combinação destes ácidos, podem ser usados no tratamento de superfícies de titânio. Este tratamento de superfície permite aumentar a adesão celular e a formação de osso e consequentemente aumenta a osteointegração (Jemat, Ghazali, Razali, & Otsuka, 2015).

Para além do condicionamento ácido supracitado, também pode ser aplicado o condicionamento ácido duplo. Neste tratamento de superfície, a mesma é submetida a

uma combinação de ácidos, simultaneamente ou sequencialmente. Estudos demonstraram que o uso do duplo condicionamento ácido apresenta melhores resultados quando sujeitas ao torque de remoção reverso e durante o processo de osteointegração. Isto deve-se maioritariamente à microrugosidade conferida à superfície durante este procedimento (Jemat et al., 2015).

A microtexturização superficial obtida pelo ataque ácido pode ser combinada com a macrottexturização devido ao jateamento com partículas (por exemplo óxido de alumínio ou cerâmica (Jemat et al., 2015).

As superfícies implantares submetidas a este processo designa-se SLA (S-Sandblast, L-Large Grit, A- Acid Etching). O princípio deste tratamento é promover, numa superfície previamente jateada com partículas de grão grosso (normalmente óxido da alumínio ou titânio), a erosão da superfície com recurso a um ácido. Desta forma é possível obter uma superfície com macrorugosidade e pequenas cavidades. Estudos indicam que as maiores cavidades nesta superfície apresentam dimensões entre 5 µm e 20 µm de diâmetro, e as cavidades de menores dimensões possuem dimensões entre 0,5 µm e 3 µm de diâmetro (Jemat et al., 2015). Esta superfície é descrita como promotora da proliferação celular e diferenciação osteoblástica e osteoclástica (Hotchkiss, Ayad, Hyzy, Boyan, & Olivares-Navarrete, 2017).

2.4.4 Superfícies nanotexturizadas

Enquanto a microtexturização da superfície implantar apenas atua ao nível celular na osteointegração, a nanotexturização abrange interações a nível dos componentes celulares, tais como proteínas (Smeets et al., 2016).

Os tratamentos necessários para obter superfícies nanotexturizadas são de dois tipos: Tratamento eletroquímico e condicionamento com laser + oxidação com plasma eletrolítico.

No primeiro caso, o método eletroquímico também designado por anodização ou oxidação anódica (Kirmanidou et al., 2016), as superfícies implantares são sujeitas a um tratamento eletrolíticos sendo posicionadas como ânodos em células galvânicas e utilizado como eletrólito ácidos fosfórico (Wirth et al., 2017). Durante o processo de anodização, existe uma interação entre zonas onde é formado camadas de óxido e zonas onde essa camada é dissolvida. O resultados desta interação é a formação de microporos

que aumentam exponencialmente com o aumento da voltagem tendo estas dimensões que variam entre 3µm e 10µm (Park et al., 2007; Peto et al., 2002; Wirth et al., 2017).

Durante o processo de anodização forma-se uma camada na superfície implantar com 5% de fosforo (na forma de fosfato) e TiO₂ (óxido de titânio) dispostos numa matriz amorfa que quando comparado com a superfície SLA, permite um menor potencial de osteointegração (Wirth et al., 2017)

No segundo caso, o condicionamento com laser promove a formação de uma camada de óxido de titânio enquanto controla a rugosidade da superfície (Wirth et al., 2017).

Este processo envolve um tratamento prévio de condicionamento com laser Nd:YAG a 50kW com frequência de 7,5 KHz. Seguidamente o implante é processado numa solução contendo glicerofosfato pentahidrato disódico a 3,5%, monohidrato de cálcio a 1,2% durante 15 segundos a uma voltagem de 350 V e frequência de 800 Hz. Este procedimento induz uma oxidação por microarco obtendo-se uma melhor rugosidade de superfície em comparação com a oxidação por anodização (Wirth et al., 2017).

Um estudo indicou que este tratamento de superfície aumentou em 20% o torque de remoção do implante quando comparado com as superfícies maquinadas e jateadas (Peto et al., 2002).

3. Doença peri-implantar

Inicialmente, os implantes de titânio estavam desenhados para possuírem uma durabilidade entre os 20-25 anos. No entanto, a taxa de insucesso precoce dos implantes é de 10%, sendo a maior causa destas infeções bacterianas 1 ano após a implantação. *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* são alguns dos exemplos de bactérias que estão na origem da inflamação tecidual e consequente recessão óssea pelos mecanismos da peri-implantite (Damiati et al., 2018).

A doença peri-implantar apresenta fatores etiológicos comuns à periodontite. Em pacientes diagnosticados com peri-implantite moderada/severa, o surgimento da doença ocorre, em média, 3 anos após a implantação e apresenta um padrão não linear de agravamento num período de 9 anos (Salvi, Cosgarea, & Sculean, 2017).

3.1 Definições

3.1.1 Saúde peri-implantar

A saúde peri-implantar pode ser caracterizada clinicamente e histologicamente. Clinicamente, a saúde peri-implantar apresenta ausência de sinais de inflamação e hemorragia à sondagem. Tanto em implantes com o nível ósseo normal como com nível ósseo reduzido, a saúde peri-implantar pode estar presente (G. Caton et al., 2018). Histologicamente, apresenta-se com tecido conjuntivo coberto por epitélio queratinizado ou não queratinizado (Araujo & Lindhe, 2018).

3.1.2 Mucosite peri-implantar

A mucosite peri-implantar é caracterizada, clinicamente, como apresentando hemorragia à sondagem e sinais visíveis de inflamação dos tecidos e histologicamente verifica-se a existência de um infiltrado inflamatório bem definido que se estende desde do tecido conjuntivo até à membrana basal (Heitz-mayfield & Salvi, 2018). A mucosite peri-implantar precede a peri-implantite (G. Caton et al., 2018).

3.1.2 Peri-implantite

A peri-implantite pode ser definida como uma condição patológica associada à placa bacteriana que ocorre nos tecidos em redor de um implante dentário. Esta condição é caracterizada por inflamação da mucosa peri-implantar e consequente perda progressiva de suporte ósseo, estando associada a um fraco controlo de placa e/ou história de periodontite severa (Mavrogenis et al., 2009; Schwarz, Derks, Monje, & Wang, 2018).

3.2 Etiologia da peri-implantite

O modelo atual da etiologia da doença periodontal/doença peri-implantar, assenta no conceito de sinergia e disbiose polimicrobiana (Frédéric, Michel, & Selena, 2018). Em pacientes suscetíveis, a disbiose, espoleta uma resposta inflamatória do hospedeiro causando lesões nos tecidos circundantes ao implante e consequente perda de osso alveolar (Frédéric et al., 2018).

3.3 Prevalência e incidência da peri-implantite

A prevalência da peri-implantite, comparativamente com a prevalência da periodontite, não se encontra tão bem estudada uma vez que os estudos desta doença ainda estão numa fase inicial e os estudos existentes sobre a sua prevalência apresentam valores bastantes divergentes. Esta divergência deve-se às diferentes classificações utilizadas aquando da realização destes estudos (Frédéric et al., 2018).

Numa revisão sistemática, Dreyer et al. (2018) concluiu que a prevalência da peri-implantite é de 18,8% (95% CI 16.8%-20.8%), sendo este valor consistente com restantes estudos descritos. Nessa mesma revisão, Dreyer et al. (2018) demonstrou que fatores como o tabaco, diabetes e presença de periodontite são fatores de risco para a doença peri-implantar. Já a idade e o género não se apresentam como fatores de risco para a peri-implantite (Dreyer et al., 2018).

Fatores como a qualidade do osso do leito implantar, cargas oclusais, biotipo gengival e hábitos de higiene podem ser determinantes para a formação e progressão da peri-implantite (Schwarz et al., 2018).

A nova classificação das peri-implantites, apresentada no congresso Europerio9 permitirá uma avaliação mais detalhada da prevalência da peri-implantite a nível mundial (COSGAREA, SCULEAN, SHIBLI, & SALVI, 2019).

3.4 Microbiologia da peri-implantite

Numa fase inicial do estudo da microbiologia da periodontite, Socransky et al. (1998) agrupou as bactérias causadoras da periodontite num 5 complexos distintos ao qual designou de Complexo de Socransky (Figura 2) (Socransky, Haffaiee, Cugini, Smith, & Kent Jr., 1998).

Os membros do complexo amarelo (*Streptococcus spp.*) e do complexo roxo (*A. odontolyticus* e *V. parvula*) são os colonizadores primários do biofilme dentário. Membros do complexo verde (*E. corrodens*, *A. a. comitans*, e *Capnocytophaga spp.*), laranja (*Fusobacterium*, *Prevotella*, e *Campylobacter spp.*) e vermelho (*P. gingivalis*, *B. forsythus*, e *T. denticola*) são os colonizadores secundários (Mahajan, Singh, Kashyap, Kumar, & Mahajan, 2013).

Membros do complexo verde e laranja estão associados a algumas infecções periodontais e não-periodontais. Os membros do complexo vermelho estão associados a localizações com hemorragia à sondagem, sendo que as bactérias deste complexo se associam com bactérias do complexo laranja (Mahajan et al., 2013).

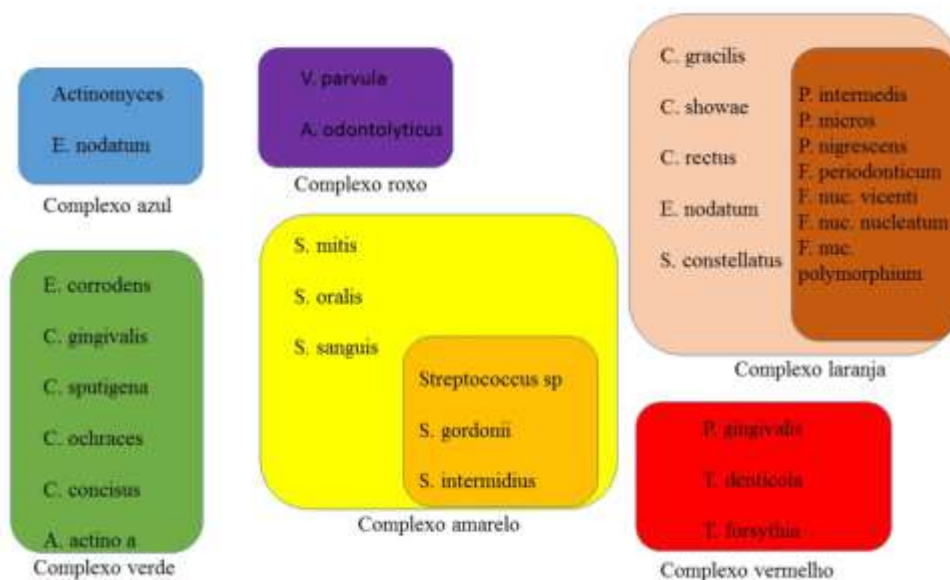


Figura 2- Complexo de Socranski (Adaptado e devidamente autorizada por Teles, Teles, Frias-Lopes, Paste & Haffajee, 2013)

Este modelo de colonização foi transposto para os implantes, sendo assumido que a periodontite e a peri-implantite partilhavam características semelhantes. No decorrer do tempo, verificou-se que, apesar de algumas características serem semelhantes entre a periodontite e a peri-implantite, esta última possui algumas especificidades, nomeadamente a nível microbiológico (Pokrowiecki, Mielczarek, Zaręba, & Tyski, 2017).

Posteriormente foi possível determinar quais as bactérias mais predominantes em zonas de lesões peri-implantares. Num estudo realizado por Persson et al. (2013) concluiu-se que quando comparado com zonas de implantes saudáveis, as zonas de lesões peri-implantares apresentaram contagem superiores para 19 espécies bacterianas sendo elas *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrichia buccalis*, *Prevotella intermedia*, *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas. gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus. anaerobius*, *Streptococcus intermedius*,

Streptococcus mitis, *Tennerella forsythia*, *Tennerela. denticola*, e *Treponema socranskii* (Persson & Renvert, 2014).

Foram ainda detetadas associações entre a peri-implantite e patógenos oportunistas tais como as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, fungos como *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Penicillium spp.*, *Rhadorula laryngis*, *Paelicomycetes spp* e vírus como o *Citomegalovirus* e o vírus *Epstein-Barr* (Schwarz et al., 2018).

3.5 Relação entre a peri-implantite e os tratamentos de superfície

As superfícies implantares cuja rugosidade varia entre os 1,1 µm e 2 µm possuem valores de osteointegração mais elevados, sendo que superfícies com rugosidade superior a 2 µm são as mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença peri-implantar. A evidência científica demonstra que superfícies rugosas são mais suscetíveis a peri-implantites do que superfícies lisas (Arnhart et al., 2013).

A evidência científica demonstra também que superfícies rugosas são mais propícias à adesão e fixação bacteriana do que as superfícies lisas (Lang & Lindhe, 2015). Isto deve-se à elevada área de contacto e à dificuldade de limpeza da superfície, resultando num aumento da taxa de multiplicação das bactérias pré-existentes (Singh, 2013). Associado à rugosidade, também a energia de superfície é fator relevante na adesão e desenvolvimento do biofilme bacteriano, quer a nível subgingival que a nível supragingival (Zhang et al., 2015).

4. Microbioma oral

Nas últimas duas décadas foram desenvolvidos e aperfeiçoados métodos independentes de meios de cultura para inoculação, isolamento e identificação das espécies bacterianas. Técnicas como a hibridação ADN-ADN e a sequenciação de genes das porções 16S do ARN ribossomal, são alguns dos exemplos de métodos que permitiram o aumento do conhecimento do microbioma oral e as suas implicações na saúde e na doença periodontal (Abusleme et al., 2013)

Sabe-se que existem cerca de 700 espécies bacterianas e 25000 filotipos presentes no microbioma oral, no entanto, a sua caracterização completa ainda se encontra por determinar (Pokrowiecki et al., 2017).

Na boca é possível encontrar diversos tipos de tecidos, condições de crescimento e nutrientes permitindo assim microbioma diferentes consoante a localização. Por exemplo, as bolsas periodontais providenciam um habitat ideal para o crescimento de bactérias anaeróbicas proteolíticas, sendo este um meio anaeróbio e rico em nutrientes como péptidos secretados no fluido crevicular. O microbioma da saliva assemelha-se com o encontrado na língua e difere significativamente do encontrado nos dentes e superfícies radiculares (Frédéric et al., 2018).

4.1 Constituintes do microbioma oral

Uma característica saliente no microbioma oral é que este pode ser agrupado em três zonas da cavidade oral distintas: Dente, dorso lingual e gengiva queratinizada. A Figura 2 é uma representação gráfica da abundância de cada espécie nos diferentes habitats (Mark Welch, Dewhirst, & Borisy, 2019).

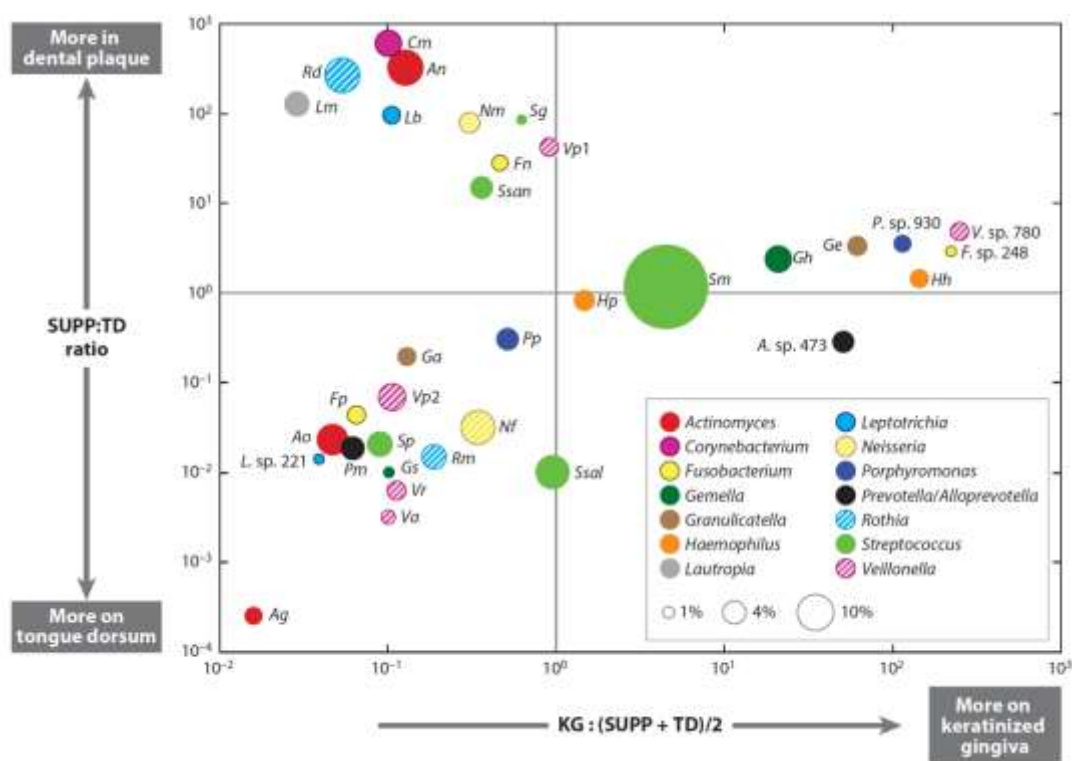


Figura 3- Especificidade do microbioma oral em diferentes zonas. Os pontos coloridos representam as espécies e a posição de cada ponto representa a sua abundância em três zonas distintas da cavidade oral: Placa supragengival, dorso da língua, e gengiva queratinizada; O eixo Y demonstra a proporção entre a abundância normalizada dos táxons na placa supragengival e a abundância normalizada no dorso da língua; O eixo X demonstra a proporção entre a abundância normalizada na gengiva queratinizada e a média da abundância normalizada na placa supragengival e dorso da língua; A área de cada ponto é proporcional à abundância média dos táxons nas localizações com valores mais elevados de abundância normalizada; A cor representa o gênero. (Cedido e devidamente autorizado por Mark Welch, Dewhirst, & Borisy, 2019)

4.2 Adesão bacteriana e formação do biofilme em superfícies de implantes de titânio

O biofilme pode ser definido com uma massa de microrganismos que se agrega e multiplica numa superfície sólida, tipicamente na presença de um fluido que submerge os microrganismos. Os componentes presentes no biofilme maduro são aproximadamente 5-25% de bactérias e 75-95% de matriz glicoproteica (Huang, Li, & Gregory, 2011).

Uma vez que os implantes e os dentes se encontram num ecossistema semelhante, a cavidade oral, o biofilme possui uma formação e composição semelhantes. O processo de formação de biofilme na superfície do implante é comparável à formação de biofilme em dentes naturais. As características da superfície do material colonizado podem influenciar a quantidade e a composição da formação de biofilme. No entanto, o papel das propriedades da superfície implantar na formação de biofilme ainda não se encontra totalmente estudado (Pokrowiecki et al., 2017).

A colonização bacteriana da superfície implantar começa cerca de 30 minutos após a introdução do implante na cavidade oral. A adesão inicial começa em locais onde as bactérias são protegidas das forças de cisalhamento (por exemplo nas regiões peri-implantares mais profundas). A adesão inicial de bactérias é promovida por forças hidrofóbicas, eletrostáticas e van der Waals que aproximam as bactérias da superfície do implante. Após este período inicial, as bactérias aderidas ligam-se às proteínas presentes na película aderida previamente formada tornando esta ligação irreversível permitindo que a atividade metabólica bacteriana se inicie (Figura 4). A natureza desta ligação irreversível não se encontra totalmente descrita (Pokrowiecki et al., 2017).

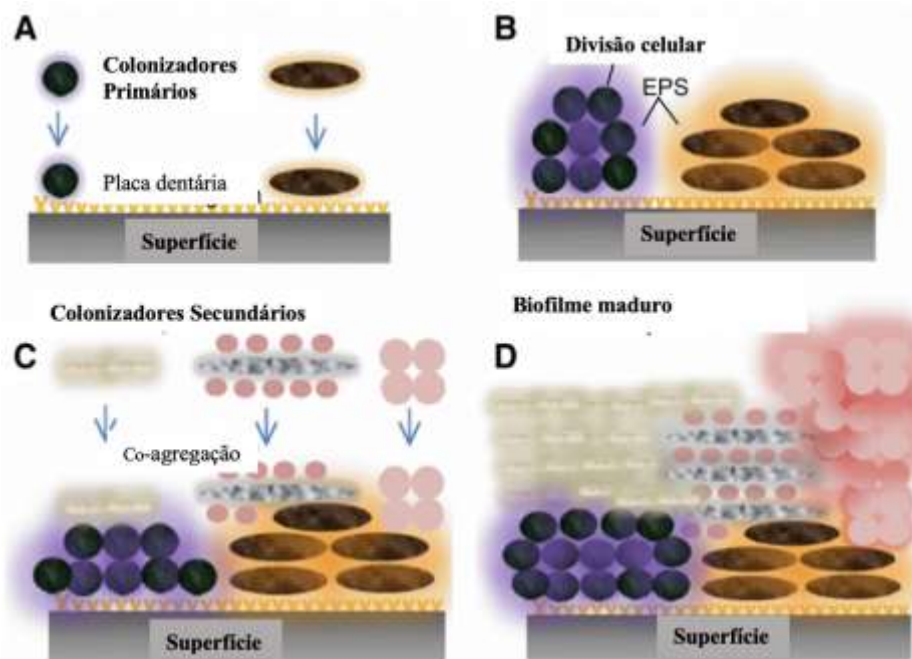


Figura 4- Representação esquemática da formação e co-agregação de biofilme multi-espécie (a) formação inicial de biofilme por colonizadores primários num substrato coberto com película adquirida; (b) crescimento celular, divisão e produção da matriz extracelular (EPS); (c) co-adesão dos colonizadores secundários; (d) maturação e formação dos biofilmes multi-espécie (Adaptado de Souza et al., 2015)

As características da superfície do material colonizado podem influenciar a quantidade e a composição da formação de biofilme. No entanto, o papel das propriedades da superfície implantar na formação de biofilme ainda não se encontra totalmente estudado. Os padrões de colonização bacteriana nas superfícies implantares encontra-se primeiramente associados à rugosidade da superfície e secundamente à molhabilidade da mesma (Pokrowiecki et al., 2017).

No que diz respeito à rugosidade, sabe-se hoje que uma superfície mais rugosa tende a acumular maior número de bactérias que uma superfície lisa. Este facto deve-se maioritariamente à deposição das colónias bacterianas nas irregularidades das superfícies obtendo-se assim um meio ideal para o seu crescimento, estando estas protegidas das agressões na cavidade oral tal como a ação da saliva e dos seus componentes. Quanto à molhabilidade, conhece-se hoje que superfícies hidrofóbicas apresentam maior adesão bacteriana que superfícies hidrofílicas. Este fenómeno pode ser explicado pelo princípio da termodinâmica baseado nas forças de adesão calculado pela teoria DLVO (Derjaguin and Landau, Verwey and Overbeek) (Pokrowiecki et al., 2017). Esta tem como base a premissa de que os microorganismos são partículas inertes. Desta forma, a energia potencial de interação entre os dois corpos é resultado de uma combinação entre as forças atrativas de van der Waals e as forças elétricas repulsivas (Araújo et al., 2010). Uma vez

que a maioria das bactérias da cavidade oral possuem paredes celulares com carácter hidrofóbico aderem mais facilmente a superfícies com carácter semelhante. Analogamente, bactérias com carácter hidrofílico iram aderir mais facilmente a superfícies implantares com igual carácter. Deve ser tido em conta a diversidade microbiana da cavidade oral e a sua capacidade de alteração da molhabilidade (Pokrowiecki et al., 2017).

Para além das características da superfície é necessário ter em consideração o material constituinte do implante, uma vez que, por exemplo, a zircónia e o titânio apresentam padrões de colonização bacterianos distintos (Pokrowiecki et al., 2017). A existência do titânio, presente nos implantes, na cavidade oral pode estar envolvida na iniciação e progressão da doença peri-implantar. Numa revisão sobre a peri-implantite, a corrosão do titânio foi apontada como sendo uma das causas da perda óssea peri-implantar. A presença de uma camada de dióxido de titânio na superfície implantar é fundamental para a sua biocompatibilidade, no entanto caso esta se encontre enfraquecida ou interrompida, pode existir corrosão do titânio (D. M. Daubert & Weinstein, 2019).

A presença bacteriana sobre a superfície de titânio afeta as propriedades eletrocondutoras podendo levar à criação de correntes elétricas e consequente corrosão do titânio (D. M. Daubert & Weinstein, 2019). Um dos exemplos mais relevantes de bactérias capazes de promover esta corrosão é a *Streptococcus mutans*. O metabolismo bacteriano aliado ao consumo de oxigénio desta espécie, levam à acumulação do mesmo sobre a superfície implantar induzindo assim ao processo de corrosão (Fukushima, Mayanagi, Nakajo, Sasaki, & Takahashi, 2014).

A presença de sacarose no meio aumenta a formação do biofilme da superfície implantar de titânio alterando as propriedades bioquímicas e microbiológicas da mesma. Devido a estas alterações a colonização de espécies anaeróbias é favorecida (J. Souza et al., 2019).

As superfícies de titânio possuem a capacidade de absorver minerais como o cálcio e o fosfato de cálcio. Estes, por um lado, contribuem positivamente para a osteointegração, por outro favorecem a adesão bacteriana (Yoshinari, Oda, Kato, & Okuda, 2001).

Quando colocado no osso, os implantes devem apresentar a sua superfície rugosa totalmente coberta de osso, não sendo esta exposta à união com os tecidos moles nem ao ambiente da cavidade oral. Por vezes, tal não acontece, uma vez que devido à remodelação da crista óssea no período pós-cirúrgico expõem-se a porção mais coronal

do implante. Caso exista insuficiente tecido mole para o devido selamento, a superfície implantar ficará exposta a contaminações presentes na cavidade oral. Isto, aliado à rugosidade da superfície, promove a adesão bacteriana e aumenta a dificuldade de higienização. Como consequência, desencadeia-se uma resposta inflamatória crônica nos tecidos peri-implantares aumentando a possibilidade de desenvolvimento de doenças peri-implantares (Bermejo et al., 2019).

A remoção das bactérias das superfícies implantares no tratamento da peri-implantite e os agentes antimicrobianos normais podem comprometer a viabilidade da superfície. Desta forma, é importante o controle do biofilme implantar em toda as fases da implantação: pré-cirúrgico, intra-cirúrgico, pós-cirúrgico e manutenção a longo prazo (D. M. Daubert & Weinstein, 2019).

Segundo Damiani (2018) existem duas estratégias para a redução da adesão bacteriana: não disponibilizar espaço, no substrato, para nenhuma bactéria e/ou aplicação de camadas anti-adesivas prevenindo-se assim a adesão das bactérias (Figura 5) (Damiani et al., 2018).

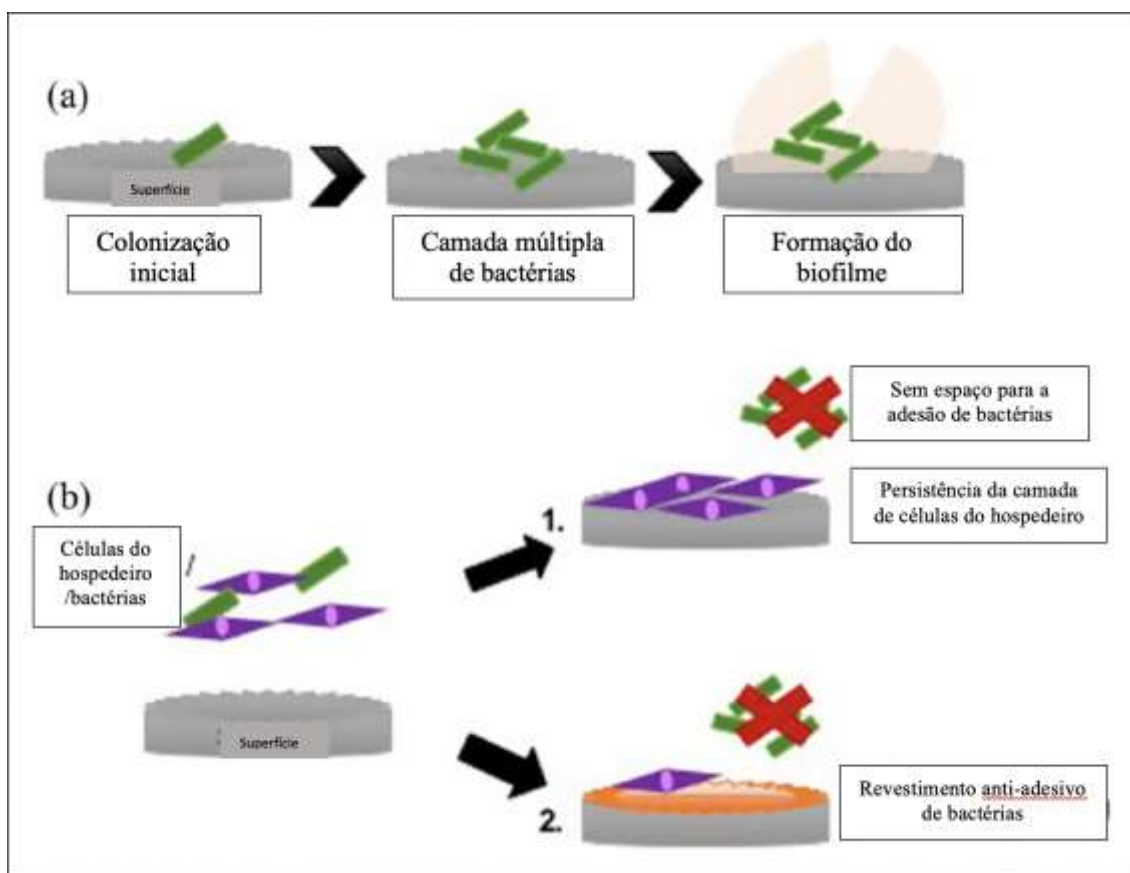


Figura 5- Processo de formação do biofilme em superfícies de titânio (a) e estratégias de redução da adesão bacteriana (b) (Adaptado de Damiani et al., (2018))

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Com este trabalho de investigação pretendeu-se:

1. Caracterizar o microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio presentes na cavidade oral de voluntários humanos;
2. Investigar o impacto dos microrganismos na estrutura dos implantes.

III. HIPÓTESES DO ESTUDO

Hipótese Nula 1: O tratamento de superfície Vellox® (misto) não influencia a penetração/adesão do biofilme bacteriano nos implantes de titânio

Hipótese alternativa 1: O tratamento de superfície Vellox® (misto) influencia a penetração/adesão do biofilme bacteriano nos implantes de titânio

Hipótese Nula 2: O biofilme não provoca alterações na superfície implantar

Hipótese alternativa 2: O biofilme provoca alterações na superfície implantar

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo piloto clínico experimental para caracterizar o microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio presentes na cavidade oral de voluntários humanos durante 48h, e para investigar o impacto dos microrganismos na estrutura dos implantes.

2. Considerações éticas

Este projeto foi avaliado e aprovado pelas seguintes entidades: Comissão Científica do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do IUEM, Direção Clínica da Clínica Universitária Egas Moniz (Anexo) e Comissão de Ética do IUEM (Anexo). Todos os participantes neste estudo foram informados e esclarecidos de toda a metodologia e pressupostos deste estudo e assinaram de forma voluntária um Consentimento Informado.

3. Local de realização do estudo

Esta investigação foi realizada no Instituto Universitário Egas Moniz, na Clínica Universitária Egas Moniz (CUEM), Laboratório de Microbiologia e de Morfologia do Instituto Universitário Egas Moniz, Laboratório da Microbiome Insights (Vancouver, Canadá), Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) e no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (I3S) entre os meses de janeiro de 2019 a setembro de 2019.

4. Amostra estudada

Este estudo foi realizado em membros da comunidade Egas Moniz, devidamente triados na Clínica Dentária Egas Moniz, saudáveis, voluntários e que preencheram os critérios de inclusão mencionados em seguida. Envolveu 25 participantes com idades compreendidas entre os 18 e 25 anos, de ambos os géneros, em conformidade com os critérios subcitados. Este foram triados na consulta de Triagem e Assistencial de Periodontologia da Clínica Universitária Egas Moniz.

4.1 Critérios de Inclusão

1. Membros da comunidade Egas Moniz voluntários na faixa etária dos 18 aos 30 anos;
2. Indivíduos sistemicamente saudáveis e não fumadores há pelo menos 6 meses;
3. Indivíduos sem reabilitações orais com implantes
4. Indivíduos sem doença periodontal ativa ($PS \leq 4$) e cáries ativas;
5. Gravidez
6. Indivíduos não portadores de diabetes;
7. Indivíduos sem antibioterapia nos últimos 6 meses
8. Indivíduos sem uso de colutórios orais antibacterianos nos últimos 6 meses

4.2 Critérios de Exclusão

1. Indivíduos que não pertencentes à comunidade Egas Moniz
2. Indivíduos com idade superior ou igual a 30 anos;
3. Indivíduos com doenças sistémicas;
4. Indivíduos com reabilitação oral com implantes;
5. Indivíduos com doença periodontal ativa ($PS > 4$) e cáries ativas;
6. Grávidas;
7. Indivíduos portadores de diabetes;
8. Indivíduos com tratamento antibiótico nos últimos 6 meses.
9. Indivíduos que utilizaram colutórios orais antibacterianos nos últimos 6 meses.

5. Materiais

- Alginato (Laboratório Schimidy®, Lote 305159)
- Espátula de alginato
- Espátula de gesso
- Graal
- Gesso tipo III amarelo (Laboratório Schmidt®, Lote 3057/24893-2)
- Pinças esterilizadas
- Luvas cirúrgicas esterilizadas Curity™ (Covidien™, Lote 3286165)
- Resina Composta flowable Tetric Evoflow® (IVOCLAR VIVADENT®, Lote X46916)

- Fotopolimerizador Elipar™ Deep Cure (3M™ ESPE)
- Espátulas angulares
- Moldeiras Standard universais metálicas perfuradas
- Kit básico de avaliação em Medicina Dentária (sonda, espelho e pinça) esterilizados
- Elastómero Putty Normosil Adición (NORMON® Dental, Lote 279844)
- Broca de acrílico de desgaste (NTI®, Lote A07001)
- Broca de acrílico de polimento NTI® (Lote A04005)
- Brocas de gesso
- Caixas de plástico coloridas para guardar próteses
- Campos cirúrgicos pequenos esterilizados
- Luvas Tamanho M descartáveis
- Adaptador de turbina
- Máscaras descartáveis
- Vórtex (Heidolph® Instruments, Ref. 591-001130-00-0)
- Acrílico Orthocryl® (DENTARUM®, Lote 469798 B)
- Pinças de titânio para implantes
- Recipientes plásticos com rosca de 120 ml
- Micropipetas
- Turbina, Micromotor e Peça de Mão da NSK
- Microbrush Proclinic descartáveis tamanho “thin”
- Tubos Eppendorf com rosca de 2 ml esterilizados
- Tubos Eppendorf de tampa de 2 ml
- Pontas para micropipeta esterilizadas
- Câmara de fluxo laminar
- Panos cirúrgicos esterilizados
- Pipeta de Pasteur plásticas descartáveis
- Álcool a 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 99%
- Reagente Hexametildisilazano a 98% (Lote 10217918)
- Glutaraldeído a 3% em tampão Cacodilato a 0,1 M
- Tampão cacodilato a 0.1M

- Suspensão microbiológica das seguintes estirpes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Candida albicans*
- Estufa universal (MEMMERT®)
- Potenciômetro (Metrohm®)
- Tubos de ensaio
- Recipiente de recolha de biópsias de 50ml
- Densitômetro DENSIMAT (BIOMÉRIEUX®)
- Suportes para tubos eppendorf
- Arame Ortodôntico de 0,60mm de diâmetro da (DENTARUM®, Lote 421920)
- Alicata 139
- Excicador com bomba de vácuo
- Caixas de Petri
- NaCl a 0,9%
- Água Ultra-Pura Esterilizada
- Hott
- Sondas periodontais graduadas (mm)
- Painel de pressão (TALLERES MESTRAITUA S.L, Ref. 030420)
- Estufa

6. Superfícies implantares analisadas

6.1 Superfície Maquinada

Implante da marca Signovinces® constituído por titânio medicinal puro F67 grau 4. Apresenta macroscopicamente espiras obtidas por fresagem de blocos de titânio. Esta foi a primeira superfície a ser comercializada e não apresenta qualquer tratamento de superfície pelo que é utilizada como controlo nesta investigação.

6.2 Superfície Vellox®

Implante constituído por titânio medicinal puro F67 grau 4. Implante do Sistema Integra® da marca Signovinces®. O tratamento de superfície destes implantes consiste

no jateamento de óxido de alumínio com granulometria controlada seguido de duplo ataque ácido. Não foi possível obter detalhes sobre os ácidos aplicados e o seu tempo de atuação, bem como sobre a dimensão das partículas de óxido de alumínio.

7. Métodos

Relativamente à metodologia seguida nesta investigação foram definidas e seguidas as seguintes fases:

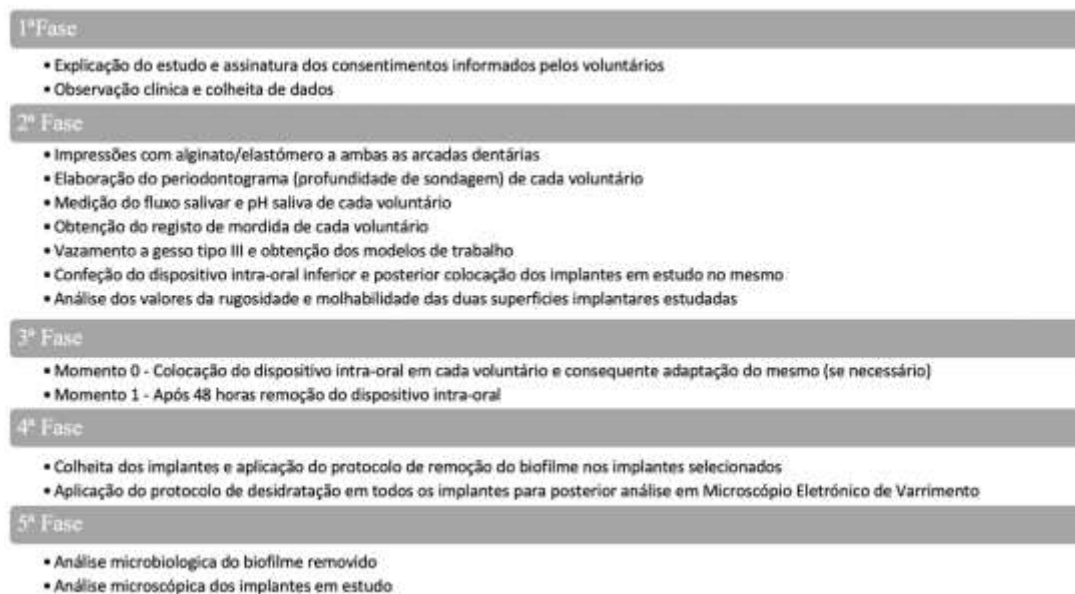


Figura 6- Cronograma das fases metodológicas do projeto de investigação

7.1 Observação clínica e colheita de dados

Primeiramente foi efetuada a triagem de todos os voluntários sendo desde logo atribuído um código numérico de 1 a 25, consoante a ordem de chegada à Clínica Dentária Egas Moniz em consultas com um período de 1 hora de duração, numa ficha anónima. Durante esta triagem foram recolhidos o género de cada voluntário e efetuada uma observação clínica onde foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão descritos anteriormente ficando estes registados na tabela de triagem (em anexo). Após a triagem, foi efetuado o preenchimento do periodontograma na consulta assistencial de periodontologia da Clínica Universitária Egas Moniz. Neste foram apenas medidas as profundidades de sondagem de cada indivíduo voluntário. Após esta análise, foi efetuada a medição do fluxo salivar não estimulado com recurso ao método descrito por Navazech (1993). Este procedimento engloba as seguintes etapas:

1. Ao minuto zero o voluntário deve engolir toda a saliva que contém na cavidade oral;
2. A língua deve estar apoiada nas superfícies linguais dos incisivos superiores;
3. A cabeça deve estar inclinada para a frente, deixando cair a saliva para o interior do tubo, sem cuspir ou mastigar.

Durante todo o período da colheita o voluntário deve estar sentado, direito, em posição relaxada, com a cabeça levemente inclinada para a frente e com os olhos abertos. A saliva foi colhida num tubo graduado. A colheita de saliva não estimulada teve uma duração de 5 minutos. Os resultados expressam-se em ml/min.

O pH da saliva foi determinado com recurso a um potenciómetro, tendo sido posteriormente conservada a -80°.

Finalmente, foi recolhido o registo de mordida de cada voluntário com recurso ao silicone de adição CyberSilicone (CyberTech®, lote 9002824) e numerado de acordo com atribuído a cada voluntário durante a fase de colheita de dados.

Terminado o exame clínico, foi selecionado o tamanho da moldeira standard de cada voluntário para a obtenção das impressões individuais.

7.2 Produção do dispositivo intra-oral

Nesta investigação as duas superfícies implantares analisadas foram: superfície maquinada (Signovinces®, lote 57751) como controlo e a superfície Vellox® (Signovinces®, lote 54795).

1. Foram realizadas impressões da arcada superior e inferior de cada voluntário deste estudo usando alginato cromático (SCHMIDT®, lote 305159). Foram usadas proporções equivalentes de água e pó (1:1). A mistura foi obtida com recurso a espátula plástica de alginato no interior de um graal de silicone à temperatura ambiente. Por forma a obter uma mistura homogénea e sem grumos, foi realizado movimentos em 8, incorporando a água e o pó, em conformidade com as instruções do fabricante.

2. As impressões foram vazadas a gesso tipo III (SCHMIDT®, lote 3057/24893-2), obtendo-se os modelos de trabalho sobre os quais se confeccionaram os dispositivos intra-orais. Cada modelo foi identificado, na sua base, com o número correspondente ao atribuído a cada voluntário durante a fase de colheita de dados.

3. Com recurso ao modelo de trabalho, foram confeccionados os dispositivos intra-orais individualizados baseado no estudo de Ferreira Ribeiro *et al.* (2016). Para a elaboração da estrutura metálica dos mesmos foi utilizado arame ortodôntico de aço inoxidável com 6mm de diâmetro (DENTAURUM®, lote 421920). Esta, estendendo-se, do primeiro molar inferior até ao primeiro molar inferior da arcada oposta percorrendo toda a face lingual dos dentes inferiores (excetuando sétimos e oitavos molares), serve como apoio à estrutura em acrílico. Nos sextos molares, e como forma de retenção do dispositivo, o arame foi dobrado sob a forma de grampo de Adams. Após obter-se a estrutura metálica foi contruído, na zona vestibular dos pré-molares inferiores de ambos os lados da arcada inferior, uma caixa em acrílico ortodôntico autopolimerizável (Ortocryl®, lote 469798) com formato cilíndrico tendo as seguintes dimensões: 18mm de comprimento e 4 mm de diâmetro. Seguidamente à polimerização efetuou-se o polimento dos dispositivos com borrachas de polimento de acrílico (Figura 7). No final da sua confeção cada dispositivo foi identificado, na caixa de acrílico do lado esquerdo, com o número correspondente ao voluntário atribuído no início do estudo. Os dispositivos foram guardados em mangas esterilizadas em ambiente de temperatura (23±2) °C, humidade relativa (50±10) % e luz controlada até à sua esterilização.

4. Os dispositivos intra-orais, após a sua fabricação e antes da introdução dos implantes em estudo, foram esterilizados sob contrato com a empresa BoneEasy® (Aveiro, Portugal) segundo o seguinte procedimento sob:

- 1- Lavagem por jateamento de vapor de água pura em sala limpa ISO7 classe A;
- 2- Ultrassons em 3 incrementos de águas puras;
- 3 -Dupla embalagem e esterilização com óxido de etileno.

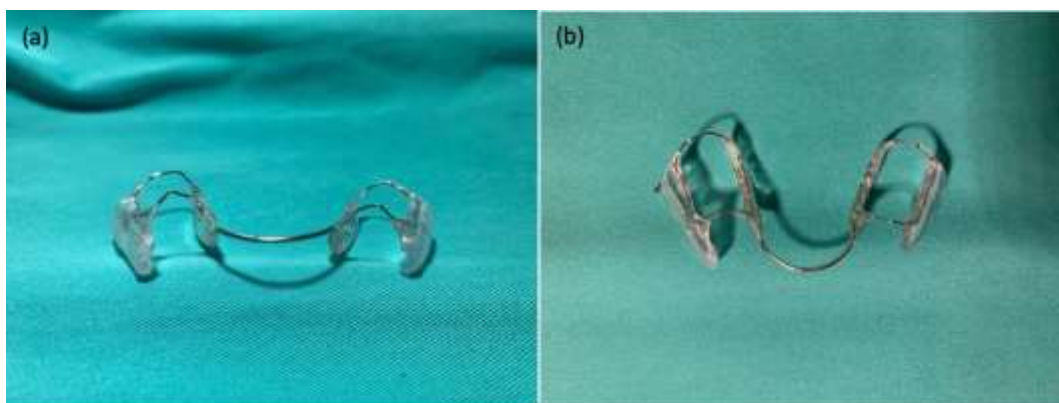


Figura 7- Dispositivo intra-oral após confecção; (a) Vista frontal; (b) Vista superior

7.3 Preparação e introdução das amostras no dispositivo intra-oral

A colocação dos implantes nos dispositivos intra-orais ocorreu dentro de uma câmara de fluxo laminar de forma a manter um ambiente esterilizado. A fixação dos implantes nas caixas de acrílico foi feita através do colo dos mesmos e com recurso à resina composta fotopolimerizável Tetric EvoFlow A1 (IVOCLAR VIVADENT®, lote X46916). Em todos os dispositivos os implantes foram colocados paralelamente às caixas de acrílico e com a zona mais apical do mesmo para o exterior da caixa. Nos dispositivos intra-orais contendo 2 implantes de cada lado, foi tido o cuidado para que os mesmos não contactassem entre si. Os implantes estudados foram colocados em número de 1 em cada lado do dispositivo perfazendo um total de 2 implantes por voluntário. Em 4 dos 23 voluntários, escolhidos aleatoriamente e em número igual de género, foi adicionado 1 implante de cada superfície em ambos os lados do dispositivo perfazendo 4 implantes no total em cada voluntário. Em todos os dispositivos intra-orais os implantes com superfície Vellox® localizavam-se no lado direito do dispositivo e os implantes com superfície maquinada localizavam-se no lado esquerdo (Figura 8). Durante todo o período de colocação dos implantes nas goteiras foram utilizadas pinças de titânio esterilizadas para cada superfície implantar e para o manuseio dos instrumentos foi utilizado luvas esterilizadas descartáveis.

Terminada a colocação dos implantes no dispositivo intra-oral estes foram selados, ainda em ambiente estéril, em mangas previamente esterilizadas e identificadas sendo conservados nas mesmas condições descritas anteriormente.

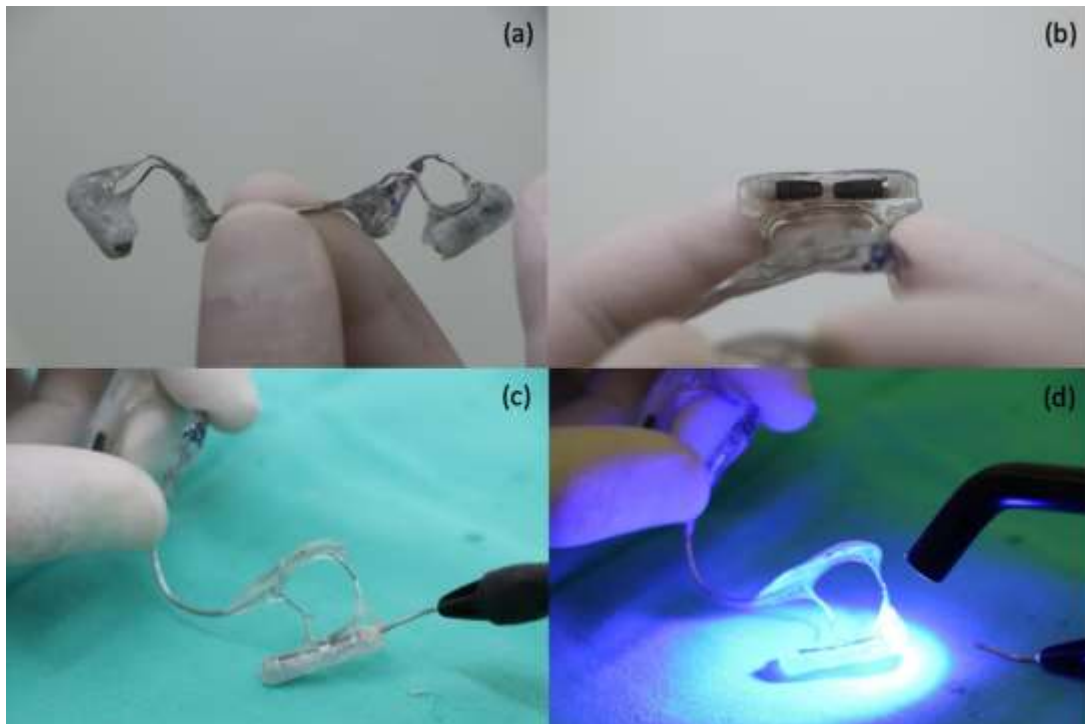


Figura 8- Colocação dos implantes em estudo no dispositivo intra-oral; (a) Vista frontal do dispositivo com os implantes; (b) Vista lateral da caixa acrílica do dispositivo com os implantes; (c) Colocação da resina composta como sistema de ancoragem dos implantes nas caixas acrílicas; (d) Polimerização da resina composta

7.4 Colocação dos dispositivos na cavidade oral dos voluntários

Os dispositivos foram introduzidos na arcada dentária inferior dos voluntários e foi questionado ao voluntário se existiria desconforto em alguma zona em contacto com o dispositivo (Figura 9). Caso se verificasse tal desconforto, e com recurso a luvas esterilizadas, o ajuste era feito de imediato. Caso o referido desconforto fosse na estrutura metálica esta era ajustada com recurso a um alicate 139. Caso o desconforto fosse na estrutura em acrílico, esta era desgastada com recurso a uma broca de desgaste de acrílico de grão médio (ISO 175) e polida com broca de polimento de acrílico de grão grosso (ISO 175). Após o ajuste, o dispositivo intra-oral foi lavado com água ultra-pura esterilizada para remover eventuais resíduos remanescentes.

Após colocação em boca e o ajuste devido, foi fornecido aos voluntários dois recipientes plásticos com tampa de rosca de 120ml contendo água ultra-pura esterilizada

e foram instruídos com os seguintes cuidados de utilização baseados no estudo Ribeiro *et al.* (2016):

- Os dispositivos não devem prejudicar a fala nem os hábitos do quotidiano dos voluntários;
 - Os dispositivos não devem interferir com a oclusão do voluntário;
 - Os dispositivos devem ser usados durante 48h consecutivas;
 - Os dispositivos devem ser retirados durante as refeições e para a escovagem dentária;
 - Ao serem retirados da boca devem ser guardadas no recipiente fornecido pelos investigadores. Este recipiente contém água esterilizada pelo que apenas o dispositivo deve entrar em contacto com a mesma.
 - Quando o dispositivo é removido do recipiente com água deve-se evitar (o máximo possível) o contacto dos dedos com a água.
 - O dispositivo deve permanecer colocado durante todo o período referido anteriormente;
 - A cada remoção do dispositivo as caixas que alojam os implantes devem ser examinadas;
1. Findo o período de 48h o dispositivo intra-oral foi retirado da boca do voluntário e armazenado num recipiente plástico com tampa de rosca contendo água ultra-pura a 4°C e conservado em igual temperatura atmosférica até ao seu processamento (num período máximo de 15 minutos).



Figura 9-Dispositivo intra-oral colocado em boca; (a)Vista oclusal, (b) Vista frontal em oclusão

7.5 Análise microbiológica

7.5.1 Controlos de adesão bacteriana

Para servirem de controlos de adesão bacteriana, especificidade e sensibilidade das análises microscópica e microbiómica foi efetuado a contaminação *in vitro* de dois implantes (um com tratamento de superfície Vellox® e outro com superfície maquinada) com recurso ao seguinte protocolo:

1. Com recurso a um densitómetro, foram preparadas suspensões com as seguintes bactérias e levedura:
 - *Escherichia coli* (Escala da MacFarland nº 0,5)
 - *Pseudomonas aeruginosa* (Escala da MacFarland nº 0,5)
 - *Enterococcus faecalis* (Escala da MacFarland nº 1)
 - *Streptococcus mutans* (Escala da MacFarland nº 1)
 - *Streptococcus mitis* (Escala da MacFarland nº 1)
 - *Candida albicans* (Escala da MacFarland nº 1)
2. A contaminação dos implantes com estes microorganismos decorreu durante um período de 6 horas onde estes eram submergidos em cada uma das suspensões durante períodos de 30 minutos às soluções microbiológicas pela seguinte ordem: 1º *Escherichia coli*, 2º *Pseudomonas aeruginosa*, 3º *Enterococcus faecalis*, 4º *Streptococcus mutans*, 5º *Streptococcus mitis* e 6º *Candida albicans*.
3. Após terminada a etapa de contaminação os implantes foram incubados a 37° na estufa por um período de 24h.
4. Findo as 24 horas os implantes foram retirados da estufa e conservados em ambiente semelhante ao do dispositivo intra-oral já descrito anteriormente.

7.5.2 Remoção dos microrganismos para a análise genómica

O processamento dos dispositivos decorreu no interior da câmara de fluxo laminar para manter um ambiente estéril evitando assim contaminação das amostras. Com recurso a uma pinça de titânio para implantes esterilizadas, cada

implante foi removido do dispositivo intra-oral (1 pinça por implante) e sujeita ao protocolo de remoção do biofilme descrito por Ferreira Ribeiro *et al.* (2016):

1. Lavar os implantes com soro fisiológico (NaCl 0.9%) esterilizado para remoção de células não aderidas;
2. Colocar os implantes em tubos eppendorf com tampa de rosca contendo 0,5 ml de soro fisiológico esterilizado;
3. Vortexar os implantes no vórtex durante 1 minutos a 3200 rpm;
4. Retirar os implantes do interior do tubo eppendorf com tampa rosca e colocá-los num outro eppendorf com tampa;
5. Conservar as amostras (tubos com implante sem bactérias e tubos com bactérias removidas do implante) a -80°C até envio para o laboratório.

A aplicação do protocolo de remoção efetuou-se em todos os implantes, excetuando aos dois implantes extra (um de cada superfície analisada) que os dispositivos com quatro implantes possuíam.

7.5.3 Caracterização do microbioma

A caracterização do microbioma foi feita sob contrato na empresa Microbiome Insights (Vancouver, Canadá). Os protocolos seguintes foram cedidos pela Microbiome Insights.

O ácido desoxiribonucleico (ADN) das amostras foi extraído usando o Kit Qiagen MagAttract PowerSoil DNA KF otimizado para o robot da Termofisher Kingfisher. Este utiliza bandas magnéticas para capturar ADN excluindo inibidores orgânicos. A região V4 (posições 515 a 806) dos genes codificantes do ARNr 16S foi ampliada com recurso à técnica de PCR (do acrónimo inglês Polymerase Chain Reaction) usando a polimerase Phusion® High Fidelity e os primers 515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', e 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Kozich et al, 2014). No caso de amostras com baixa biomassa microbiana, foi utilizado o qPCR para medir partículas específicas de ADN e determinar quantitativamente se existe qualidade suficiente de partículas para análise. As amostras possuindo baixa biomassa microbiana foram descartadas.

Os produtos de PCR foram limpos e normalizados usando o kit SequalPrep 96-well Plate.

As amostras foram então agrupadas para criar uma base de dados através do KAPA qPCR Library Quant kit. Posteriormente foram sequenciadas com recurso ao Illumina MiSeq usando primers correspondentes à base de dados do PCR realizado anteriormente. Após sequenciação, as leituras obtidas foram agrupadas em unidades operacionais taxonómicas (OTU's) com 97% de similaridade usando o software *Mothur*. As sequências de alta qualidade foram classificadas taxonomicamente com recurso à base de dados de referência Greengenes v. 13_8. Numa fase final as OTU's foram agregadas nos diferentes *rankings* taxonómicos (Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie).

O potencial de contaminação foi avaliado por co-sequenciação de DNA amplificado a partir das amostras e de 11 de cada um dos reagentes controlo sendo aplicado os mesmos reagentes dos kits de extração quer nas amostras, quer nos controlos durante o processo. As unidades taxonómicas operacionais foram consideradas contaminantes putativos (e foram removidos) se sua abundância média nos controlos atingir ou exceder 25% da sua abundância média nas amostras.

8. Avaliação da molhabilidade das superfícies implantares estudadas

Para além de caracterizar o microbioma, este estudo também pretendeu estudar a energia livre de superfície (molhabilidade) e relacioná-la com a adesão microbiana. Esta análise decorreu no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (I3S). Os estudos da molhabilidade foram realizados usando o equipamento de medição OCA 15 e com recurso a uma unidade de seringa eletrónica (Dataphysics Instruments GmbH, Germany). Este permite a medição do ângulo de contacto da gota depositada sobre a superfície implantar com base em imagens captadas por uma câmara ótica. O interior da seringa continha água pobre em deutério (DDW-Deuterium-depleted water). As medições ocorreram à temperatura ambiente. Foram utilizados 8 implantes no total sendo 4 implantes com a superfície Vellox® e 4 implantes com superfície maquinada. Os implantes usados para estas medições foram analisados logo após abertura da sua embalagem. Os ângulos de contacto estático foram medidos à temperatura ambiente através da técnica da gota séssil, sendo depositadas gotículas de 2 µl na superfície do implante. Foram depositadas, no mínimo, 12 gotas por implante e em 3 localizações distintas, sendo que em cada localização, com recurso à rotação do implante, foram colocadas 4 gotas. Nesta investigação mediu-se uma variável (ângulos de contacto)

em diferentes unidades de observação (zonas e posições) na mesma unidade experimental (implante). A medição repete-se de modo sistemático, introduzindo eventuais correlações não nulas e variâncias heterogêneas, as quais devem ser controladas na análise de dados. Para efetuar estas medições repetidas e permitir a estabilização do implante na mesa de análise foi elaborado um dispositivo acrílico que permitia a rotação de implante sobre o seu maior eixo (Figuras 10). As zonas referidas foram identificadas com as letras A (Zona Apical “Câmara de retenção óssea”- região plana e sem espiras), B (Zona Média) e C (Zona Coronal).

Nos 4 implantes de cada superfície foi efetuado o mesmo método de medição.

Os ângulos de contacto foram calculados com recurso ao software SCA (Dataphysics, version 2.0), introduzindo o perfil da gotícula na equação de Young-Laplace.



Figura 10-Processo de deposição da gota sésil sobre a superfície implantar com superfície maquinada; (a) Implante fixo ao dispositivo acrílico de fixação; (b) Análise da molhabilidade com deposição de gota sésil em 3 localizações distintas da superfície implantar (Vellox®)

9. Análise microscópica

Todos os implantes foram sujeitos ao seguinte protocolo de fixação no Laboratório de Microbiologia e de Morfologia do IUEM:

1. Fixar as bactérias aderidas com 200µl de solução de glutaraldeído a 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14M durante 30 minutos à temperatura ambiente;
2. Lavar a amostra duas vezes com 1ml de água ultra pura esterilizada;
3. Desidratar as amostras utilizando um gradiente crescente etanol (99%) /água, mantendo as amostras durante 10 minutos nas seguintes soluções:
 - a) 50%

- b) 60%
 - c) 70%
 - d) 80%
 - e) 90%
 - f) 99%
4. Após removido da última solução anterior, adicionar 400 μ l de hexametildisilazano (C₆H₁₉NSi);
 5. Deixar as amostras secar no interior da hotte durante a noite (com a tampa dos tubos eppendorf aberta);
 6. Conservar as amostras no excicador com bomba de vácuo;

A análise microscópica das superfícies implantares decorreu no Centro de Materiais da Universidade do Porto.

Previamente à observação ao microscópio eletrónico de varrimento (MEV), as amostras foram fixadas nos suportes de cobre do microscópico utilizando fita de carbono. Após este procedimento as amostras foram observadas no MEV.

O exame MEV / EDS foi realizado utilizando o Microscópio Eletrónico de Varrimento ambiental, de alta resolução (Schottky), com Microanálise por Raios X e Análise de Padrões de Difração de Eletrões Retrodificados: Quanta 400FEG ESEM / EDAX Genesis X4M. As amostras foram revestidas com filme fino de Au/Pd, por pulverização catódica (sputtering), utilizando o equipamento SPI Module Sputter Coater.

Para análise de cada grupo de implantes foram selecionadas diferentes ampliações. Estas foram determinadas consoante a finalidade e as estruturas que se pretendiam observar. Em todos os grupos os implantes foram divididos em três zonas: zona coronal, zona média e zona apical. Na observação no MEC, foram captadas imagens utilizando dois recetores distintos: recetores de eletrões secundários (ES) e recetores de eletrões retrodifundidos (BSED). Os recetores de eletrões secundários permitem detetar os eletrões de baixa valência resultado da ionização dos átomos e/ou moléculas do material em estudo. Estes são libertados, após submetidos a uma projeção de eletrões primários provenientes do cone de libertação do MEV. Esta reação consiste numa projeção inelástica (*inelastic scattering*) (Goldstein et al., 2017). Os recetores de eletrões retrodifundidos permitem detetar a porção significativa de eletrões primários que possuem energia suficiente para reverter completamente a sua trajetória regressando novamente, sob a forma de eletrões primários, à superfície da amostra. Estes são detetados permitindo

assim obter informações sobre a composição da amostra, topografia, massa e cristalografia (Goldstein et al., 2017).

Nas 3 zonas dos implantes estudados foram obtidas imagens com ampliações 250x, 2000x e 10000x. Em todos os grupos de implantes, os mesmos foram observados recorrendo a uma ampliação de 50x. Uma vez que com esta ampliação era possível visualizar toda a superfície implantar não foi necessário aplicar o protocolo de ampliação de 3 zonas do implante.

Durante a observação das superfícies implantares foi realizado, simultaneamente, e em zonas previamente escolhidas, a análise da composição elementar das mesmas. Esta foi efetuada com o recurso ao processo de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS, acrónimo do inglês Energy-dispersive X-ray spectroscopy). Este assenta no princípio físico básico que há emissão de fótons de raio-x aquando da ionização de um átomo/molécula. Esta ionização ocorre durante o processo de observação no MEV. A energia destes fótons de raio-x dependem do elemento químico ionizado (Goldstein et al., 2017). As zonas observadas foram identificadas com Z 1 e Z 2.

10. Análise estatística

Para efetuar o tratamento dos dados obtidos, foram efetuadas as análises estatísticas utilizando o teste paramétrico t para amostras emparelhadas, teste não paramétrico de Wilcoxon, Modelos Mistos com estrutura auto-regressiva de primeira ordem e o Teste de Adonis (Permanova). Foram definidos como níveis de significância de 0,005 (5%) e um intervalo de confiança de 95%. A análise foi obtida no programa Statistics Package for the Social Sciences v. 22.0 (IBM, EUA) e os dados foram exportados deste mesmo programa.

Para efetuar análise estatística dos valores resultantes da medição do ângulo de contacto ajustou-se um modelo linear misto (MM) aos dados, o qual combina o efeito fixo do fator considerado (tipo de superfície) e os efeitos aleatórios na estrutura de covariância dos resíduos. A utilização de MM requer que a estrutura de covariância entre as observações repetidas seja conhecida. Assim, foram consideradas as seguintes estruturas de covariância homogénea: Auto-regressiva de 1ª ordem (AR1); Auto-Regressiva de média móvel (ARMA), Simetria Composta (CS), Identidade (SI) e Toeplitz. A qualidade do ajustamento obtido com as diferentes matrizes foi avaliada usando os critérios de informação de Akaike (AIC), Hurvich e Tsai (AICC), Bozdogan

(CAIC) e de Bayes e Schwarz (BIC), em que valores mais baixos denotam melhor ajustamento.

A Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA) testa diferenças significativas no microbioma entre variáveis categóricas ou contínuas discretas. As amostras são reatribuídas aleatoriamente para as várias categorias de amostra (permutações de Monte-Carlo) e as diferenças entre categorias são comparadas com as verdadeiras diferenças entre categorias (Anderson & Walsh, 2017).

V. RESULTADOS

1. Caracterização dos participantes no estudo

Foram recrutados 25 participantes. Três participantes abandonaram o estudo antes do final pelo que a amostra final foi de 22 indivíduos dos quais 16 (73%) do género feminino e 6 (27%) do masculino.

2. Molhabilidade superficial

Os valores obtidos na avaliação da molhabilidade de cada superfície estão expressos na tabela (ANEXO I). Nas figuras 11 e 12 estão representadas as imagens obtidas pelas câmaras durante a medição do ângulo de contacto.

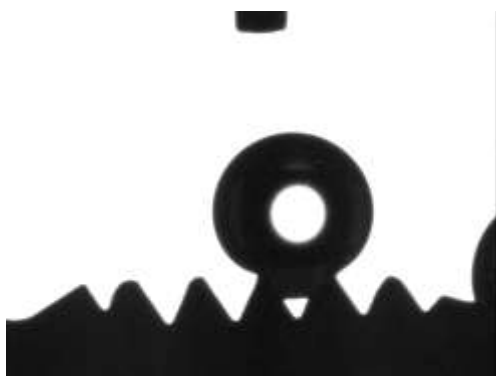


Figura 11- Imagem da câmara ótica para medição do ângulo de contacto na superfície Vellox®



Figura 12- Imagem da câmara ótica para medição do ângulo de contacto na superfície maquinada

Pela observação inicial das imagens não é possível detetar diferenças evidentes no ângulo de contacto formado. Uma das grandes limitações à medição do ângulo de contacto com implantes é a irregularidade macroscópica da superfície conferida pelas espiras. Tal limitação será abordada no capítulo da discussão.

3. Análise microscópica

3.1 Análise microscópica de implantes sem contaminação

As imagens obtidas pela análise através do microscópio eletrônico de varrimento dos implantes sem contaminação são as seguintes:

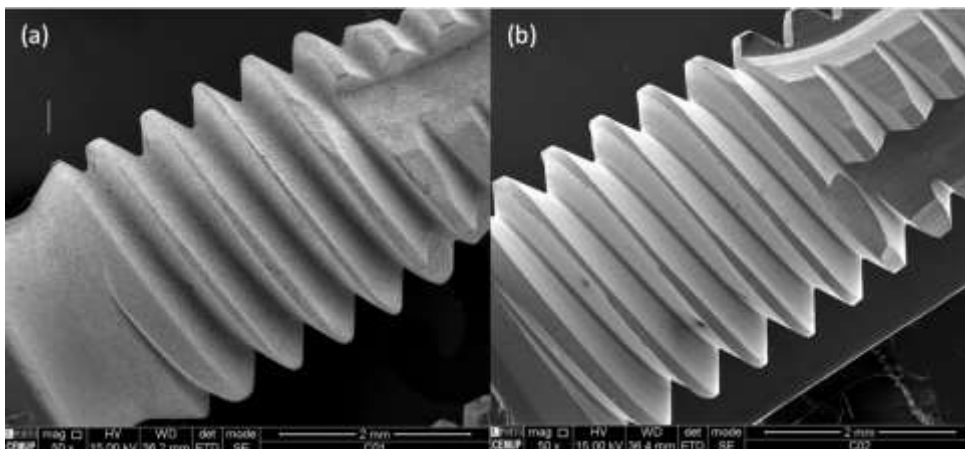


Figura 13- Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com ampliação 50x; (a) Superfície Vellox, (b) Superfície Maquinada. (Imagem captada por recetores de elétrons secundários)

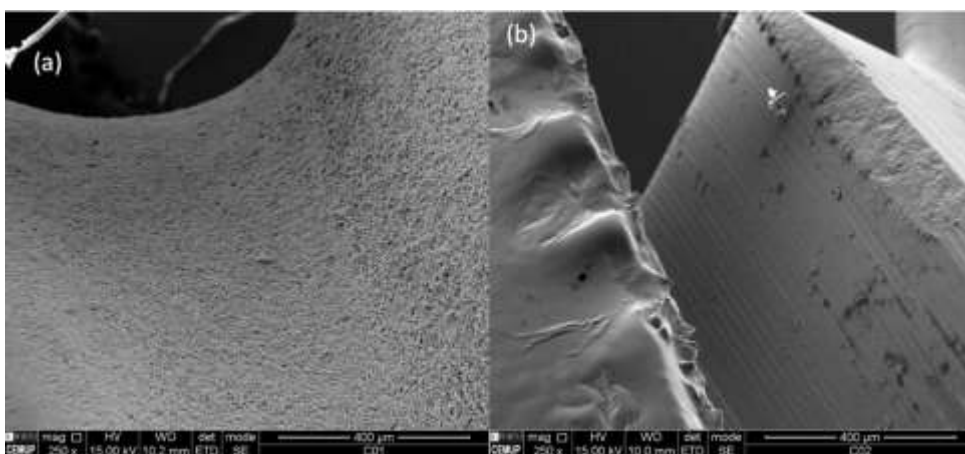


Figura 14- Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com ampliação 250x; (a) Superfície Vellox®, (b) Superfície Maquinada. (Imagem captada por recetores de elétrons secundários)

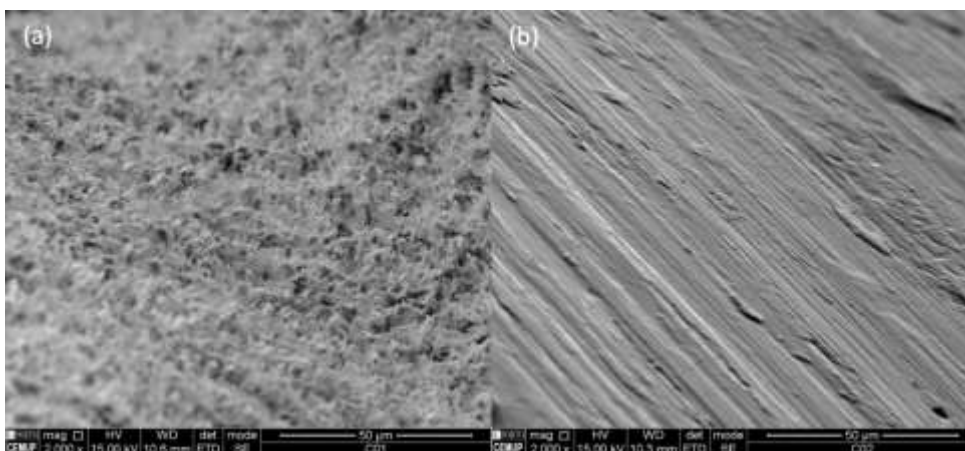


Figura 15- Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com ampliação 2000x; (a) Superfície Vellox, (b) Superfície Maquinada. (Imagem captada por recetores de elétrons secundários)

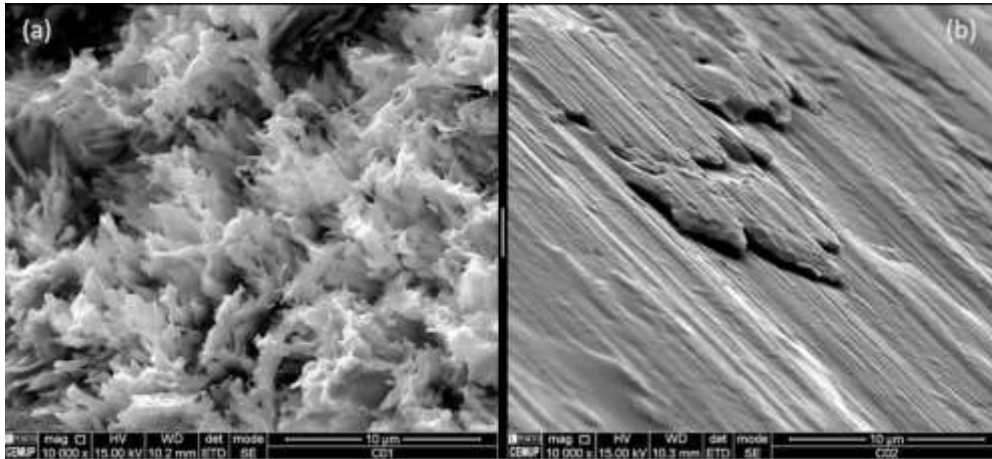


Figura 16-Imagem obtida pela observação de implantes sem contaminação (Vellox® e maquinados) com o MEV com ampliação 10000x; (a) Superfície Vellox, (b) Superfície Maquinada. (Imagem captada por recetores de elétrons secundários)

Através da observação microscópica dos implantes (Figuras 13,14,15 e 16) é possível visualizar as diferenças topográficas de ambas as superfícies. Nos implantes com superfície maquinada verifica-se a existência de uma superfície plana e sem irregularidades, tendo apenas as marcas resultantes do processo de fresagem, sendo estas caracterizadas por sulcos pouco profundos e paralelos entre si. Nos implantes com superfície Vellox® observa-se a existência de uma superfície irregular e uniforme, com cavidades de profundidade e disposição variável e estruturas pontiagudas no topo das mesmas.

3.1.1 Composição elementar da superfície implantar

Com recurso à espectroscopia de raios X por dispersão de energia foi possível analisar os componentes elementares constituintes da superfície implantar. Os resultados desta análise estão descritos nas figuras 17 e 18 abaixo.

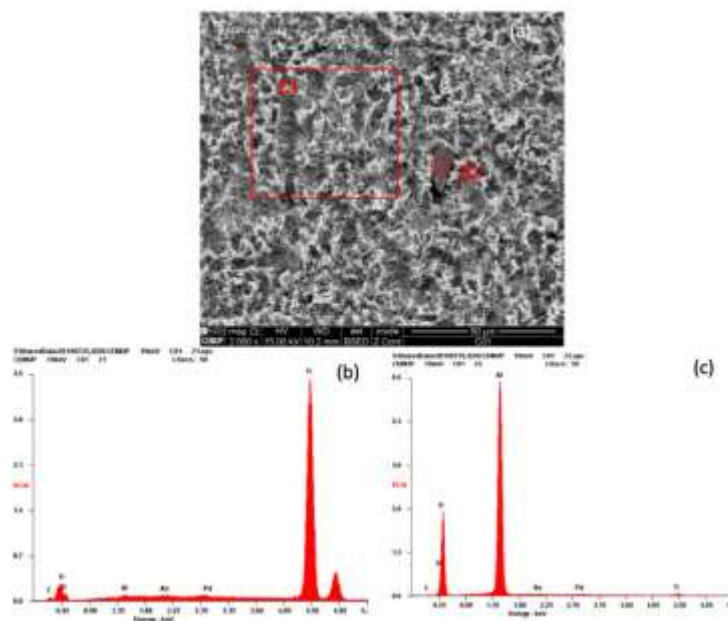


Figura 17-Resultados da espectroscopia de raios X por dispersão de energia de implantes Vellox® sem contaminação;(a) Imagem captada pelo MEV da superfície implantar Vellox® com ampliação 2000x com delimitadas as zonas 1 e 2;(b) Gráfico da espectroscopia de raios X por dispersão de energia na zona 1;(c) Gráfico da espectroscopia de raios X por dispersão de energia na zona 2.

No implante com superfície Vellox® zona 1 existe predomínio do elemento titânio, enquanto que na zona 2 é possível detectar alumínio, sendo este, possivelmente, proveniente do jateamento de óxido de alumínio durante o processo de tratamento de superfície (Figura 17).

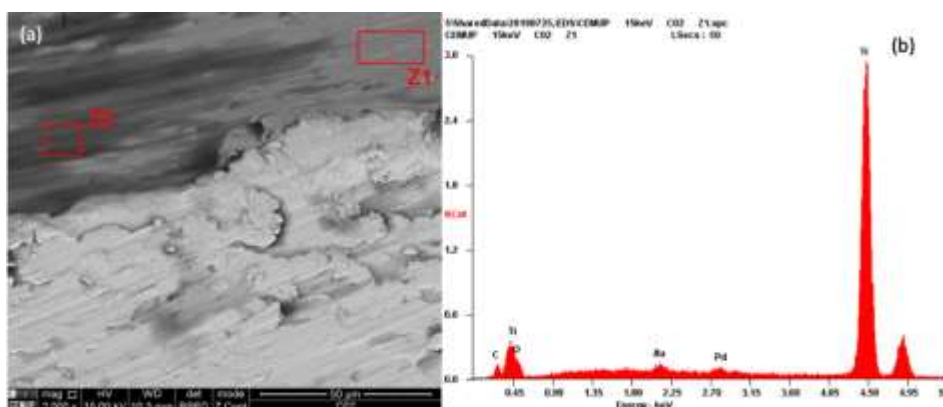


Figura 18-Resultados da espectroscopia de raios X por dispersão de energia de implante maquinado sem contaminação;(a) Imagem captada pelo MEV da superfície implantar maquinada com ampliação 10000x com delimitadas as zonas 1 e 2;(b) Gráfico da espectroscopia de raios X por dispersão de energia na zona 1; A análise da zona 2 não foi efetuada na avaliação desta superfície sendo apenas assinalada na imagem de microscópio.

Na superfície maquinada, tanto na zona 1 como na zona 2 o elemento predominante foi o titânio (Figura 18).

3.2 Análise microscópica dos implantes contaminados *in vivo* sem protocolo de remoção

Esta análise microscópica pretendia analisar a topografia da deposição bacteriana sobre as superfícies implantares.

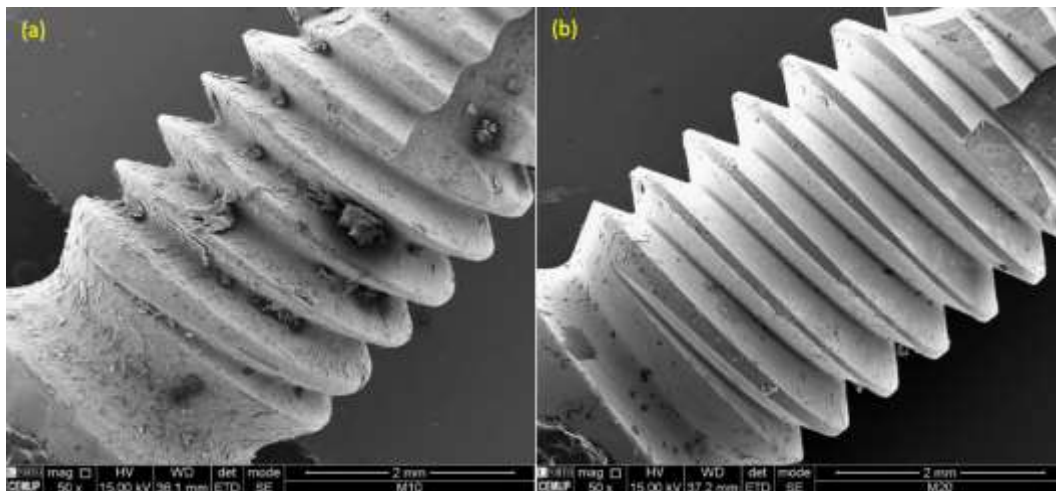


Figura 19-Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 50x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha); (a) Superfície Vellox® sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme), (b) Superfície Maquinada sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

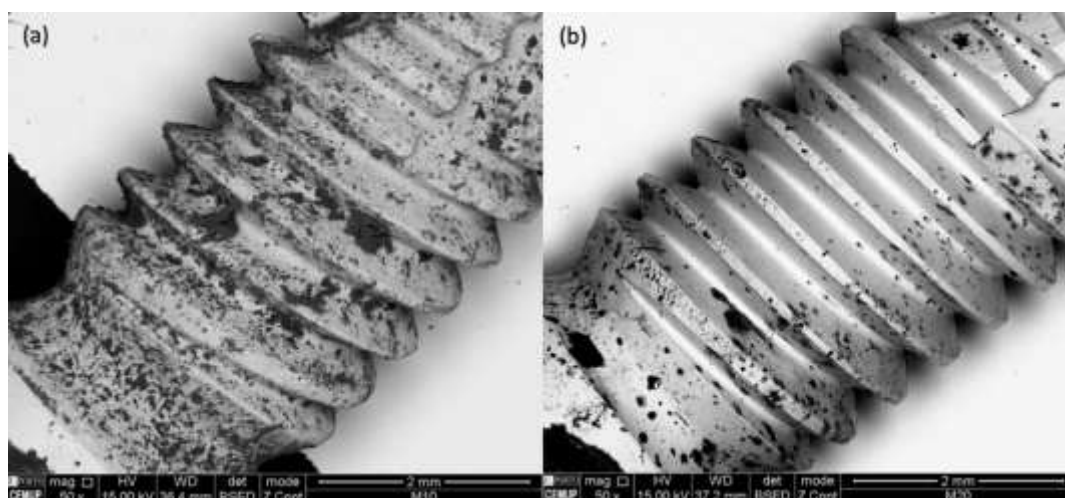


Figura 20-Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 50x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha); (a) Superfície Vellox® sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme), (b) Superfície maquinada sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões retrodifundidos)

Com recurso a uma ampliação de 50x e 250x (Figuras 19 e 21) foi possível observar um maior número de microcolónias bacterianas na superfície Vellox® quando comparada com a superfície maquinada. Com recurso às imagens obtidas por recetores de eletrões retrodifundidos (Figura 20) foi ainda possível verificar que a maior adesão de

bactérias ocorre a nível das espiras e do colo do implante. Em ambas as superfícies a adesão bacteriana decorreu de forma uniforme e semelhante ao longo de todo o comprimento do implante (apical para coronal).

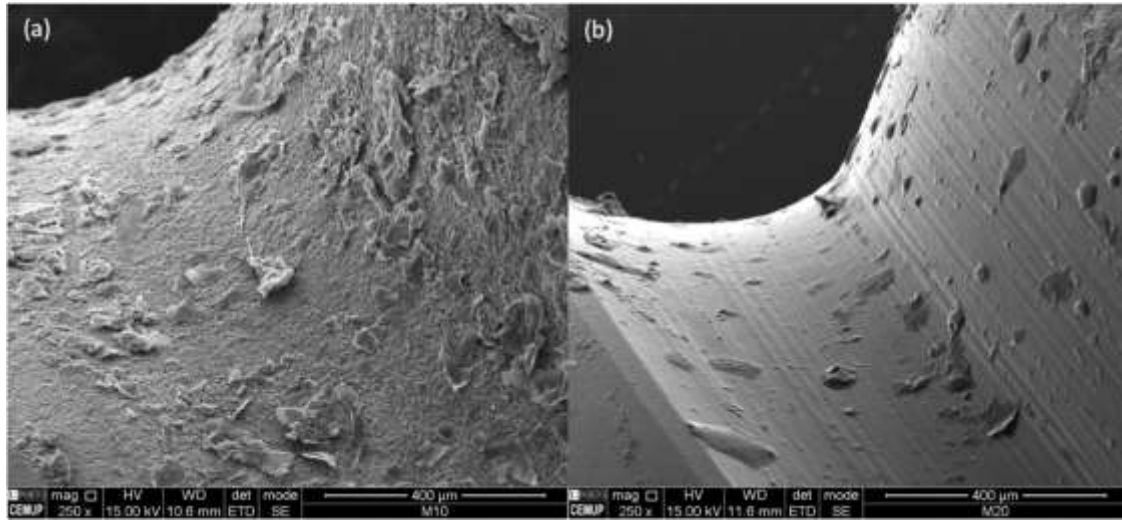


Figura 21- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 250x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha); (a) Superfície Vellox® sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme), (b) Superfície maquinada sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

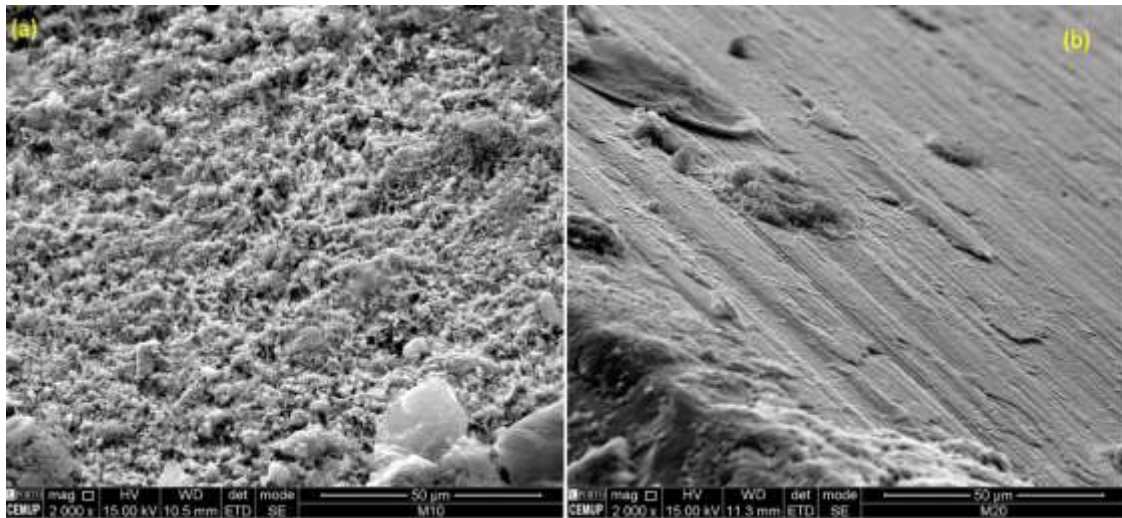


Figura 22-Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 2000x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha); (a) Superfície Vellox® sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme), (b) Superfície maquinada sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

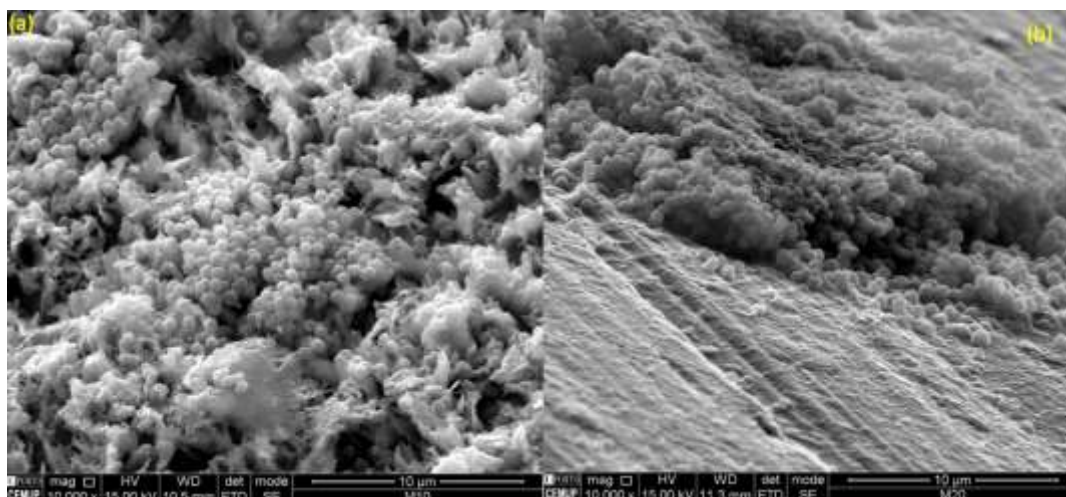


Figura 23-Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 10000x de ambas as superfícies estudadas (sem aplicação do protocolo de recolha); (a) Superfície Vellox® sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme), (b) Superfície maquinada sujeita ao meio ambiente da cavidade oral (com contaminação e sem aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

Com recurso a imagem obtidas com ampliação 2000x e 10000x (Figura 22 e 23) foi possível verificar que as colónias bacterianas na superfície Vellox® encontravam-se em maior número do que nas superfícies maquinadas e estão depositadas nas microrugosidades das superfícies. Na superfície maquinada as colónias, apesar de em menor quantidade quando comparada com a superfície Vellox®, apresentam-se, visualmente com maiores dimensões. Em ambas as superfícies foi possível observar um predomínio de bactérias com forma bacilar em detrimento de cocos. Nas imagens foi ainda possível observar pequenas placas de tecido cuja origem provável é fragmentos de mucosa decorrentes da utilização e da localização próxima da mesma.

3.3 Análise microscópica dos implantes contaminados *in vivo* com protocolo de remoção

O objetivo desta análise foi a comparação entre a superfície antes e depois de sujeitá-las ao ambiente da cavidade oral e verificar se existira alterações microestruturas na mesma visíveis microscopicamente.

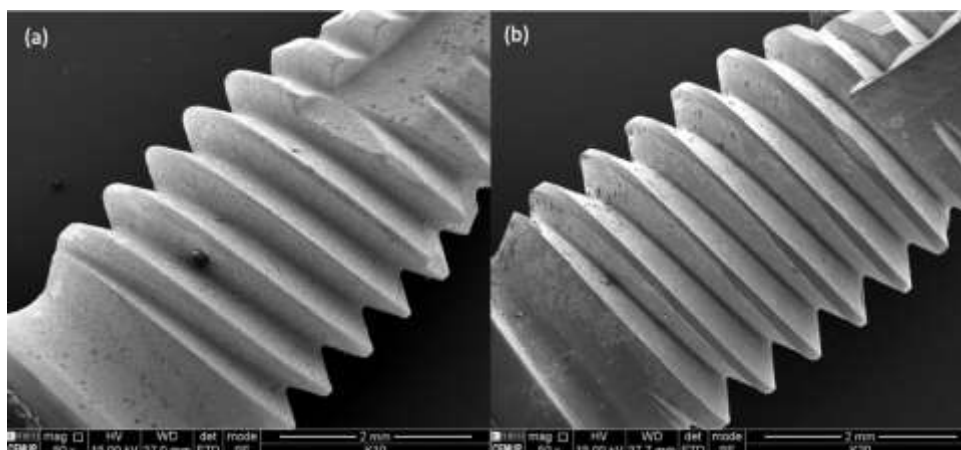


Figura 24- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 50x da superfície Vellox® e maquinada (com contaminação + protocolo de recolha) ; (a) Superfície Vellox® de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo + aplicação de protocolo de remoção do biofilme); (b) Superfície maquinada de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo + aplicação de protocolo de remoção do biofilme). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

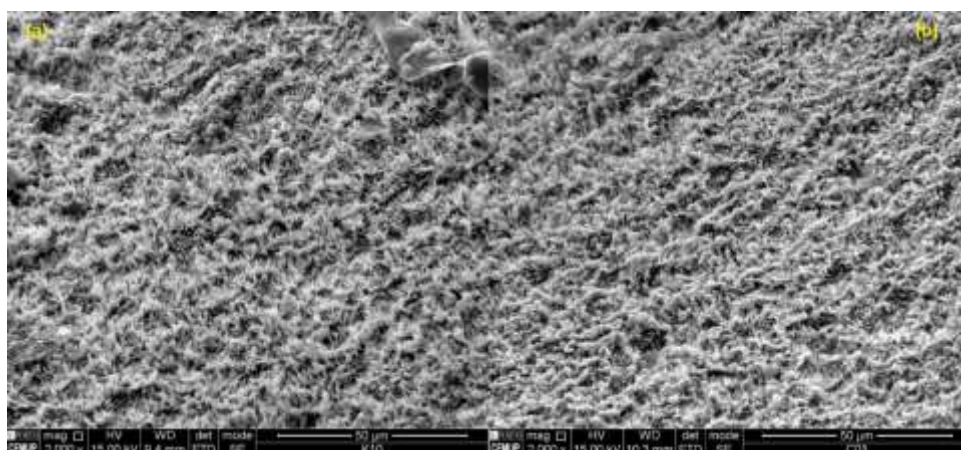


Figura 25- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 2000x da superfície Vellox® (com contaminação Vs sem contaminação); (a) Superfície Vellox® de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo + aplicação de protocolo de remoção do biofilme); (b) Superfície Vellox® de um implante não sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (sem contaminação). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

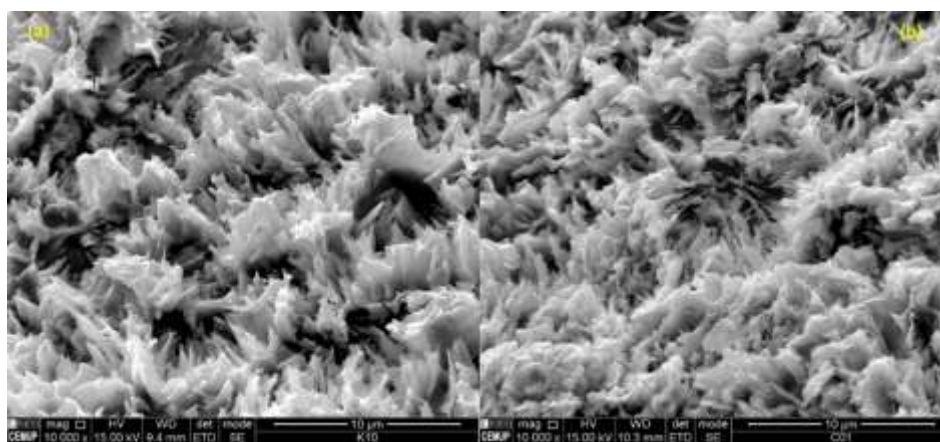


Figura 26- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 10000x da superfície Vellox® (com contaminação Vs sem contaminação); (a) Superfície Vellox® de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo + aplicação de protocolo de remoção de biofilme); (b) Superfície Vellox® de um implante não sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (sem contaminação). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

No que toca aos implantes com superfície Vellox® foi possível verificar-se que não existiu alteração estrutural microscópica após a exposição da mesma aos microorganismos da cavidade oral (Figuras 24, 25 e 26)

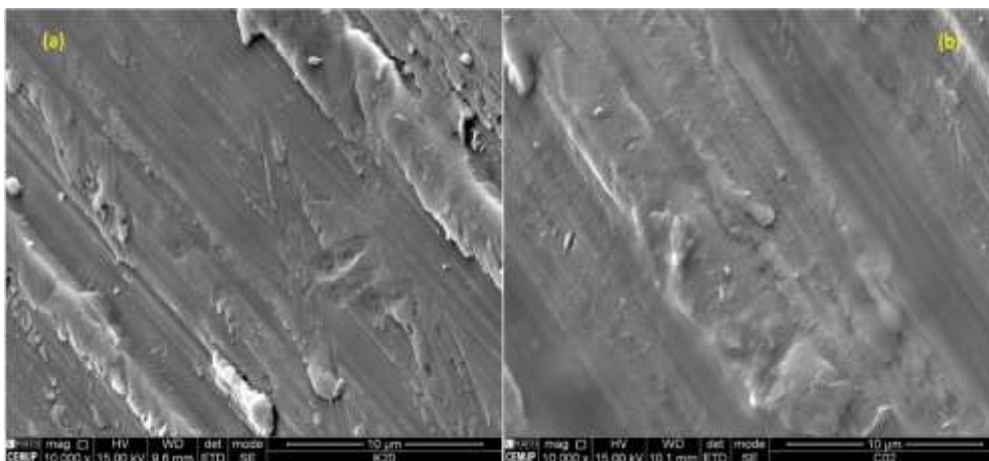


Figura 27- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 2000x da superfície maquinada (com contaminação Vs sem contaminação); (a) Superfície maquinada de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo + aplicação de protocolo de remoção do biofilme); (b) Superfície maquinada de um implante não sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (sem contaminação). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

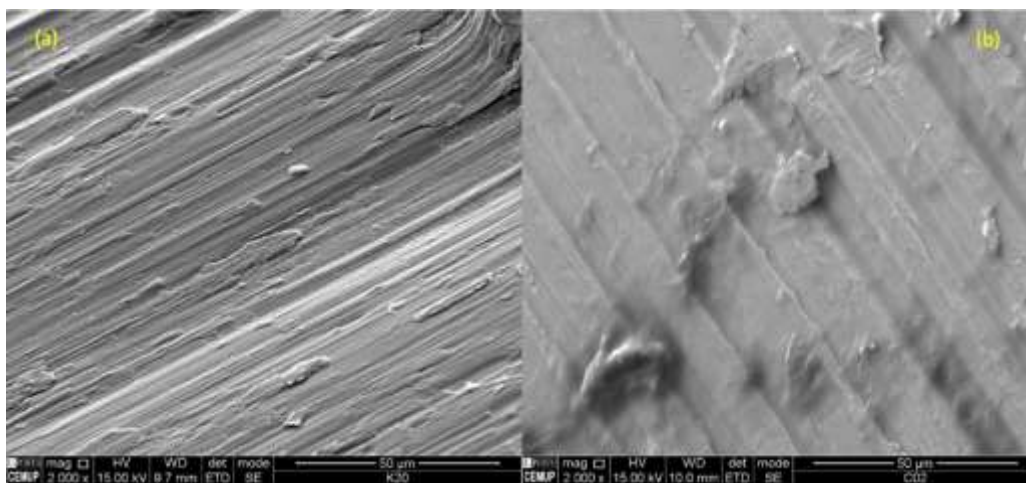


Figura 28- Imagem obtida pela observação com o MEV com ampliação 10000x da superfície maquinada (com contaminação Vs sem contaminação); (a) Superfície maquinada de um implante sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (contaminação in vivo+ aplicação de protocolo de remoção); (b) Superfície maquinada de um implante não sujeito ao meio ambiente da cavidade oral (sem contaminação). (Imagem captada por recetores de eletrões secundários)

Relativamente à superfície maquinada, tal como na superfície Vellox®, não houve alterações estruturais a nível microscópico (Figuras 27 e 28).

4 Análise microbiológica

4.1 Análise dos implantes de controlo da adesão bacteriana (contaminados *in vitro*)

De forma consistente com os microrganismos que foram adicionados aos implantes, as imagens microscópicas revelaram a existência de bacilos, cocos e ainda uma levedura em divisão (Figura 29). Contudo, a análise microbiómica revelou a presença de *Escherichia coli*, *Streptococcus infantis* e *Haemophilus parainfluenzae* em ambas as superfícies contaminadas *in vitro*. Estes resultados revelam uma baixa sensibilidade (não foram detetados todos os microrganismos adicionados) e especificidade (foram detetados microrganismos que não foram adicionados) da análise microbiómica. Contudo, o facto de se ter detetado as mesmas bactérias nos dois tipos de implante indica claramente que as duas superfícies implantares são semelhantes na capacidade de colonização bacteriana.

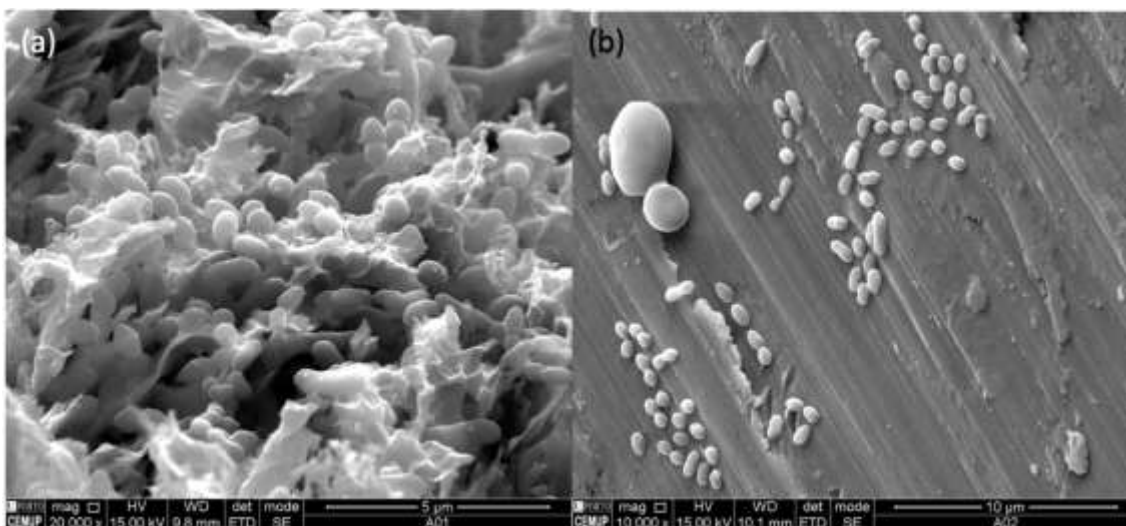


Figura 29- Imagem obtida pela observação com o MEV dos implantes de controlo;(a) Imagem da observação da Superfície Vellox® de implante contaminado *in vitro* (ampliação 20000x);(b) Imagem da observação da Superfície maquinada de implante contaminado *in vitro* (ampliação 10000x) (Imagem cedidas pelo CEMUP)

4.2 Análise dos implantes sujeitos à cavidade oral

4.2.1 Contagem das leituras

Os resultados da análise microbiológica destes implantes permitiram um total de 186 072 leituras dispostas na tabela 1.

Tabela 1- Tabela de leituras por superfície em cada indivíduo

	<i>veioxx</i>	<i>maquinaaa</i>
1	3340	6101
2	1865	1289
3	6329	7710
4	6917	6548
5	1785	178
6	7403	3572
7	4287	6859
8	5374	244
9	3106	263
10	6481	1188
11	4739	1265
12	3151	3625
13	6369	5087
14	5769	336
15	517	306
16	5789	6185
17	5265	6485
18	7938	7278
19	3654	4576
20	6048	6596
21	5474	8442
22	195	144
<i>Total</i>	101795	84277

Devido à presença de amostras com baixas leituras apenas foram incluídas, para classificação taxonómica, 16 indivíduos (correspondendo a 32 amostras). Foram assim excluídos os indivíduos número 5, 8, 9, 14,15 e 22.

As leituras obtidas durante o processo de sequenciação foram posteriormente agrupadas em unidades operacionais taxonómicas (OTU's) com 97% de similaridade obtendo-se um total de 2169 OTU's.

4.2.2 Classificação taxonómica das sequências obtidas

Após a identificação dos OTU's, estes foram agregados em cada *ranking* taxonómico (Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie) obtendo-se os seguintes resultados:

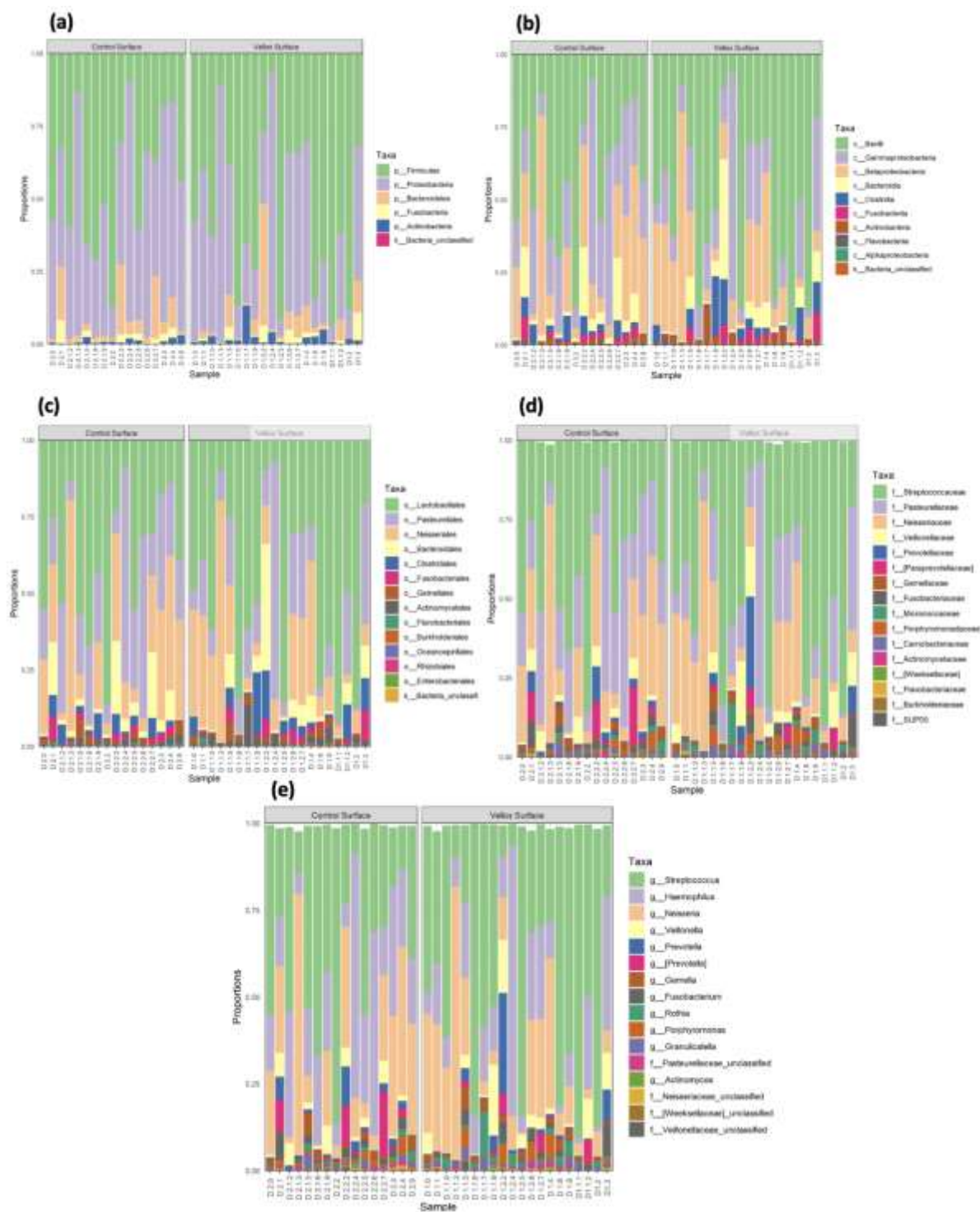


Figura 30-Taxa de agregação em cada ranking taxonômico; (a) Filo; (b) Classe; (c) Ordem; (d) Família; (e) Género

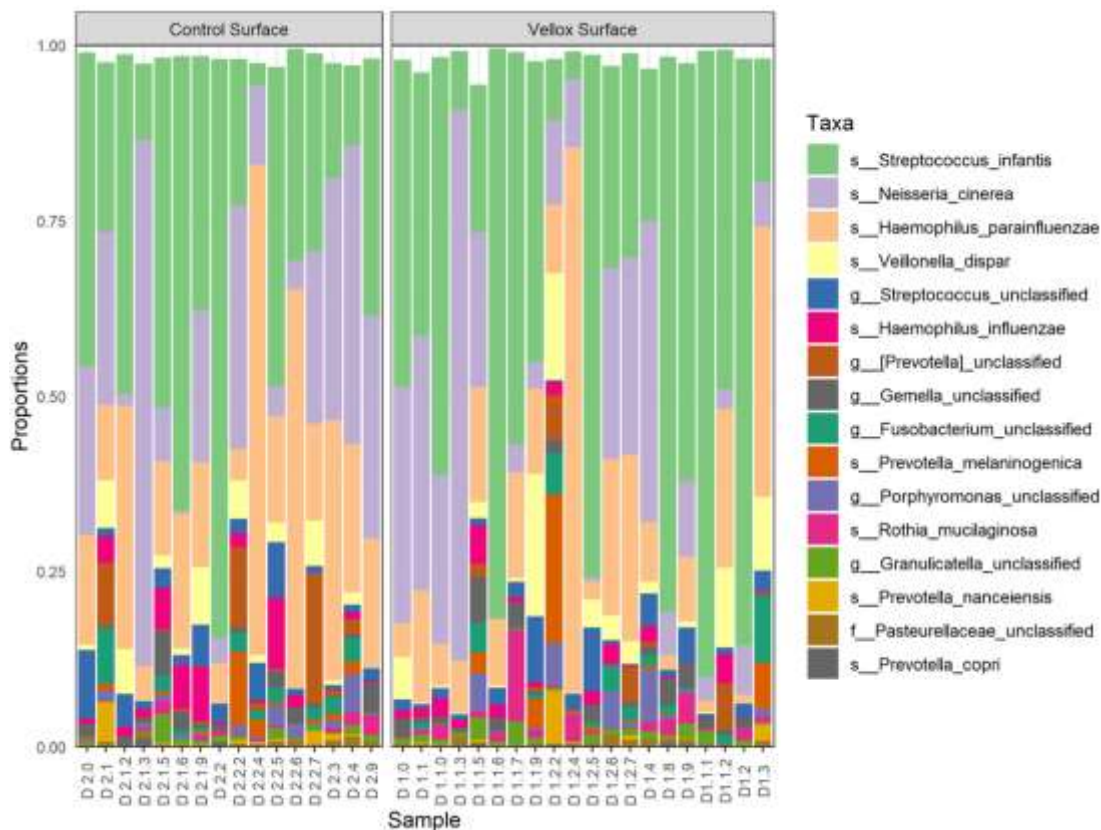


Figura 31-Taxa de agregação por espécie

Através do Figura 31 verifica-se a existência de 34 diferentes espécies bacterianas. Estas encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2-Espécies bacterianas identificadas pela análise microbiológica dos implantes estudados

Streptococcus infantis	Veillonella parvula
Rothia mucilaginosa	Veillonella dispar
Haemophilus parainfluenza	Rothia dentocariosa
Capnocytophaga ochracea	Prevotella nanceiensis
Escherichia coli	Prevotella melaninogeni
Haemophilus influenzae	Prevotella copri
Neisseria cinerea	Gemella não classificadas
Abiotrophia não classificadas	Actinomyces não classificadas
Bacterioides não classificadas	Brucellaceae não classificadas
Capnocytophaga não classificadas	Eikenella não classificadas
Enterococcus não classificadas	Fusobacterium não classificada
Granulicatella não classificada	Lautropia não classificadas
Leptotrichia não classificadas	Neisseria não classificadas
Neisseriaceae não classificadas	Pasteurellaceae não classificadas
Porphyromonas não classificadas	Prevotella não classificada
Streptococcus não classificadas	Veillonellaceae não classificadas
Weeksellaceae não classificadas	Kingella não classificadas

4.2.3 Proporções bacterianas

Devido a um número reduzido de leituras, não foi possível determinar as proporções bacterianas para os indivíduos 5, 8, 9, 14, 15 e 23, restando apenas 16 indivíduos.

4.2.3.1 Proporções de *Enterococcus* não classificados e *Escherichia coli*

Na tabela 3 e 4 estão representadas as proporções de *Enterococcus* não classificados e *Escherichia coli* presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 3-Proporções de *Enterococcus* não classificados

Tabela 4-Proporções de *Escherichia coli*

Proporções <i>Enterococcus</i> não classificados			Proporções <i>Escherichia coli</i>		
Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada	Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0012	0	1	0,0006	0
2	0,0033	0,0024	2	0	0
3	0,0005	0,0007	3	0	0
4	0	0,0010	4	0	0
6	0,0001	0,0003	6	0,0007	0
7	0	0,0004	7	0	0,0006
10	0,0014	0	10	0	0
11	0,0009	0,0037	11	0	0,0028
12	0	0,0026	12	0	0
13	0,0005	0,0014	13	0,0013	0,0008
16	0	0,0002	16	0	0,0016
17	0,0011	0	17	0	0,0003
18	0,0013	0	18	0	0,0003
19	0,0008	0,0014	19	0,0003	0,0014
20	0	0,0003	20	0	0
21	0,0002	0,0004	21	0,0004	0,0014

4.2.3.2 Proporções de *Fusobacterium* não classificada e *Porphyromonas* não classificadas

Na tabela 5 e 6 estão representadas as proporções de *Fusobacterium* não classificadas e *Porphyromonas* não classificadas presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 5-Proporções de *Fusobacterium* não classificada Tabela 6-Proporções de *Porphyromonas* não classificada

Proporções <i>Fusobacterium</i> não classificada			Proporções <i>Porphyromonas</i> não classificadas		
Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada	Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0085	0,0794	1	0,0030	0,0158
2	0,0005	0	2	0,0005	0,0008
3	0,0944	0,0238	3	0,0125	0,0106
4	0,0155	0,0327	4	0,0736	0,0549
6	0	0,0017	6	0,0001	0,0028
7	0,0036	0,0018	7	0,0048	0,0021
10	0,0117	0	10	0,0005	0
11	0,0020	0,0009	11	0,0005	0,0074
12	0,0419	0,0216	12	0,0549	0,0098
13	0,0002	0,0056	13	0,0021	0,0052
16	0,0062	0,0038	16	0,0029	0,0038
17	0,0590	0,0272	17	0,0605	0,0119
18	0,0010	0,0135	18	0,0014	0,0032
19	0,0067	0,0215	19	0,0006	0,0288
20	0,0348	0,0008	20	0,0541	0,0186
21	0,0182	0,0165	21	0,0074	0,0045

4.2.3.3 Proporções *Actinomyces* não classificada e *Prevotella melaninogenica*

Na tabela 7 e 8 estão representadas as proporções de *Actinomyces* não classificada e *Prevotella melaninogenica* presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 7-Proporções *Actinomyces* não classificadasTabela 8-*Prevotella melaninogenica*

Proporções <i>Actinomyces</i> não classificadas			Proporções <i>Prevotella melaninogenica</i>		
Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada	Indivíduos	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0003	0,0005	1	0	0,0090
2	0,0005	0,0016	2	0	0,0008
3	0,0042	0,0001	3	0,0647	0,0095
4	0,0060	0,0016	4	0,0054	0,0186
6	0,0023	0,0011	6	0,0001	0,0031
7	0,0045	0,0001	7	0	0,0004
10	0,0002	0	10	0,0003	0
11	0,0007	0,0009	11	0	0,0009
12	0,0030	0,0035	12	0,0296	0,0052
13	0,0005	0,0024	13	0	0
16	0,0125	0,0020	16	0,0413	0,0051
17	0,0015	0,0017	17	0,2121	0,1053
18	0,0011	0,0159	18	0,0036	0,0237
19	0,0028	0,0016	19	0,0061	0,0045
20	0	0,0002	20	0,0005	0,0005
21	0	0,0002	21	0,0037	0,0049

4.2.3.4 Proporções de *Prevotella nanceiensis* e *Prevotella* não classificadas

Na tabela 9 e 10 estão representadas as proporções de *Prevotella nanceiensis* e *Prevotella* não classificada presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 9-Proporções *Prevotella nanceiensis*

Indivíduos	Proporções <i>Prevotella nanceiensis</i>	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0024	0,0565
2	0	0
3	0,0237	0,0094
4	0,0003	0,0022
6	0	0,0003
7	0,0014	0
10	0	0
11	0,0002	0
12	0,0040	0,0026
13	0,0002	0,0002
16	0,0004	0,0003
17	0,0755	0,0056
18	0,0023	0,0035
19	0,0003	0,0036
20	0,0005	0,0002
21	0,0063	0,0191

Tabela 10-Proporções *Prevotella* não classificada

Indivíduos	Proporções <i>Prevotella</i> não classificada	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0018	0,0898
2	0	0,0008
3	0,0022	0,0079
4	0,0064	0,0221
6	0	0,0009
7	0,0019	0,0003
10	0,0663	0
11	0,0007	0,0009
12	0,0186	0,0023
13	0,0003	0,0036
16	0,0054	0,0038
17	0,0627	0,1150
18	0,0005	0,0104
19	0	0,0032
20	0,0003	0,0002
21	0,0506	0,1862

4.2.3.5 Proporções *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginosa*

Na tabela 11 e 12 estão representadas as proporções de *Rothia dentocariosa* e *Rothia mucilaginosa* presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 11-Proporções *Rothia dentocariosa*

Indivíduos	Proporções <i>Rothia dentocariosa</i>	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0034	0,0002
2	0,0005	0,0008
3	0,0002	0,0024
4	0,0012	0,0022
6	0,0004	0,0026
7	0,0026	0,0021
10	0	0
11	0	0
12	0,0017	0,0023
13	0,0003	0,0008
16	0,0002	0,0003
17	0,0002	0,0006
18	0,0003	0,0001
19	0	0,0073
20	0	0,0002
21	0	0

Tabela 12-Proporções *Rothia mucilaginosa*

Indivíduos	Proporções <i>Rothia mucilaginosa</i>	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0058	0,0003
2	0,0170	0,0048
3	0,0080	0,0066
4	0,0143	0,0176
6	0,0014	0,0009
7	0,0433	0,0279
10	0,0007	0
11	0,0016	0,0037
12	0,0086	0,0179
13	0,0118	0,0004
16	0,0109	0,0056
17	0,0030	0,0017
18	0,0389	0,0036
19	0,0045	0,0034
20	0,0010	0,0006
21	0,0015	0,0002

4.2.3.6 Proporções *Streptococcus infantis* e *Streptococcus não classificados*

Na tabela 13 e 14 estão representadas, respetivamente, as proporções de *Streptococcus infantis* e *Streptococcus não classificados* presentes em cada tipo de implante emparelhadas por indivíduo.

Tabela 13-Proporções *Streptococcus infantis*

Indivíduos	Proporções <i>Streptococcus infantis</i>	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,3748	0,2417
2	0,8370	0,8257
3	0,1766	0,1648
4	0,2170	0,1148
6	0,4658	0,4468
7	0,5962	0,3663
10	0,4841	0,4845
11	0,0843	0,1093
12	0,2104	0,4990
13	0,8130	0,6473
16	0,4288	0,3627
17	0,0873	0,2083
18	0,0398	0,0320
19	0,7450	0,4556
20	0,2877	0,3024
21	0,2911	0,2820

Tabela 14-Proporções *Streptococcus não classificados*

Indivíduos	Proporções <i>Streptococcus não classificados</i>	
	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	0,0061	0,0109
2	0,0213	0,0264
3	0,0278	0,0065
4	0,0467	0,0109
6	0,0150	0,0984
7	0,0538	0,0166
10	0,0098	0,0470
11	0,0084	0,0111
12	0,0093	0,0279
13	0,0237	0,0136
16	0,0939	0,0599
17	0,0026	0,0197
18	0,0222	0,0537
19	0,0905	0,0789
20	0,0059	0,0089
21	0,0024	0,0097

4.2.3.7 Restantes proporções bacterianas

As restantes proporções bacterianas encontram-se descritas na tabela (ANEXO II).

5. Análise estatística

A análise estatística focou-se na análise da molhabilidade das superfícies implantares e na análise microbiológica dos implantes contaminados *in vivo*.

5.1 Análise estatística dos valores da molhabilidade da superfície implantar

A análise estatística dos valores do ângulo de contacto mostra que os ângulos de contacto são significativamente maiores na superfície Vellox (135,6° ± 2,8), comparativamente à superfície maquinada (102,6 ± 0,4), com base numa estrutura autorregressiva de 1ª ordem, com variância e correlação homogénea ($p < 0.001$). Desta forma a superfície Vellox® apresenta menor molhabilidade que a superfície maquinada.

5.2 Análise estatística dos valores microbianos nos implantes contaminados *in vivo*

5.2.1 Alfa Diversidade e nº de leituras

A Alfa diversidade pode ser definida como a relação entre a complexidade das espécies e a sua riqueza num mesmo meio (Whittaker, 1972). Para o cálculo da alfa diversidade utilizou-se o índice de diversidade de Shannon como índice de referência. O cálculo deste índice foi efetuado tendo como base os resultados dos OTU's iniciais. A Figura 32 demonstra a comparação entre os dois grupos de estudo.

Os valores encontram-se resumidos na Figura 32 abaixo:

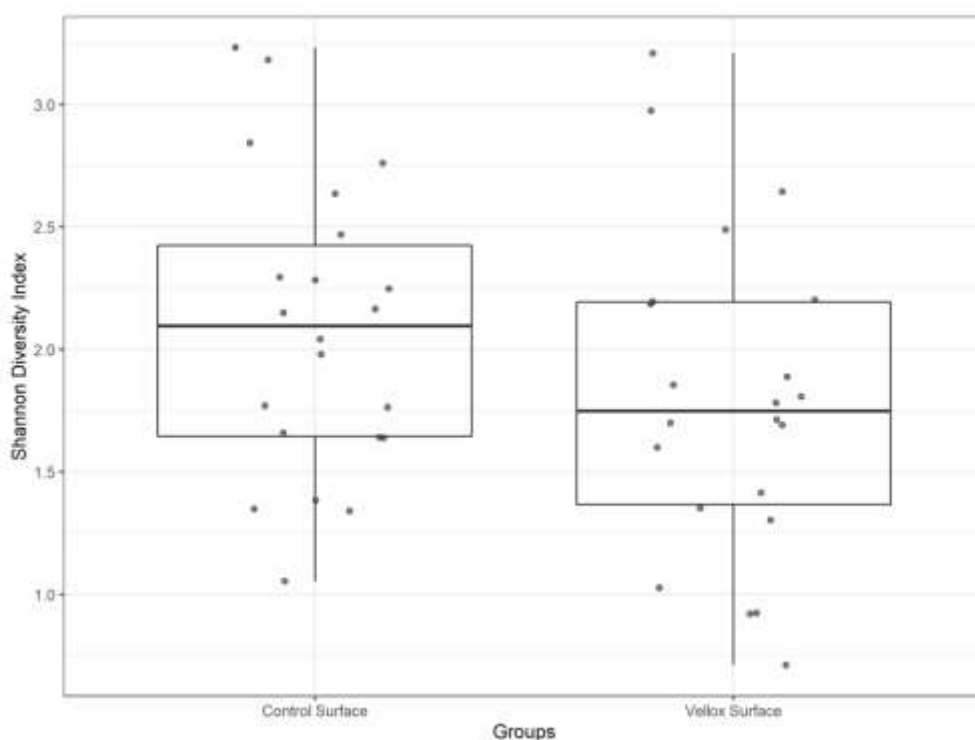


Figura 32-Boxplot para comparação dos diferentes índices de diversidade de Shannon de cada amostra

Tabela 15- Valores do índice de diversidade de Shannon em cada amostra emparelhado por indivíduo

Índices de Diversidade de Shannon		
Indivíduo	Superfície Vellox®	Superfície Maquinada
1	1,6998	2,4689
2	0,9241	1,0537
3	2,4890	1,7702
4	2,1963	2,2945
5	1,4144	3,2324
6	1,8084	1,6585
7	1,7817	1,7638
8	1,6916	2,8427
9	0,7117	2,1501
10	1,8556	1,6389
11	1,3044	1,6408
12	2,6438	2,1649
13	0,9211	1,3839
14	1,7141	2,6354
15	1,6009	2,7608
16	2,1852	1,9803
17	2,9746	2,2835
18	1,0265	1,3495
19	1,3525	2,2476
20	2,2020	1,3409
21	1,8892	2,0419
22	3,2085	3,1823

A exploração prévia destes dados relativamente à aplicação de testes paramétricos (teste t para amostras emparelhadas) revelou que as distribuições não apresentam desvios significativos à normal, exceto para o nº de leituras na superfície de controlo. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 16.

Tabela 16-Estatística descritiva para as variáveis "nº de leituras" e "Índice de Diversidade de Shannon" em cada superfície; Par 1 (nº de bactérias); Par 2 (Índices de Shannon); Média: Refere-se à média dos valores de nº de leituras no par 1 e à média dos valores do índice de Shannon no par 2

		Média	N	Desvio padrão	Erro padrão
Par 1	velox	4627,05	22	2172,352	463,147
	controlo	3830,77	22	3004,549	640,572
Par 2	sh_vellox	1,7998	22	,65518	,13969
	sh_maq	2,0857	22	,60021	,12796

Nestas condições, aplicou-se o teste t para amostras emparelhadas nas comparações entre superfícies. Os resultados obtidos constam na tabela 17, da qual se conclui não existirem diferenças significativas entre superfícies, quer para o nº de leituras quer para o índice.

Tabela 17-Resultados do teste t para amostras emparelhadas (variáveis analisadas: nº de leituras e índice de Shannon) Par 1 (nº de bactérias); Par 2 (Índices de Shannon); Média: Refere-se à média dos valores de nº de leituras no par 1 e à média dos valores do índice de Shannon no par 2

		Média	Desvio padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% entre as médias		t	df	Sig. (2-tailed)
					Baixo	Alto			
Par 1	velox - controlo	796,273	2562,369	546,299	-339,818	1932,363	1,458	21	,160
Par 2	sh_vellox - sh_maq	-,28592	,72528	,15463	-,60749	,03565	-1,849	21	,079

Face à referida violação da normalidade, as mesmas comparações foram efetuadas com o teste não paramétrico de Wilcoxon, concluindo-se, analogamente, que o nº de leituras não difere significativamente entre superfícies ($p = 0.263$), e que o índice de Shannon não difere significativamente entre superfícies ($p = 0.115$). Desta forma observa-se que a alfa diversidade e número de leituras não apresenta diferenças estatisticamente significativas.

5.2.2 Diversidade Beta e teste de abundância diferencial

A diversidade beta pode ser definida como a extensão da especificidade bacteriana ao longo do seu habitat (Whittaker, 1972), ou seja diversidade entre amostras. De forma a obter uma representação gráfica das similaridades da composição microbiana entre amostras, foram agrupados os OTU's com recurso ao Índice Dissimilaridade de Bray-Curtis. Este foi calculada pela razão entre as diferenças absolutas somadas nas contagens e a soma das abundâncias nas duas amostras (Bray & Curtis, 1957). Após a agrupar todos os OTU's, foi efetuada uma ordenação pelo Princípio da Análise das Coordenadas Principais (PCoA) baseado nos valores obtidos do Índice Dissimilaridade de Bray-Curtis estando estas representadas no na figura 33.

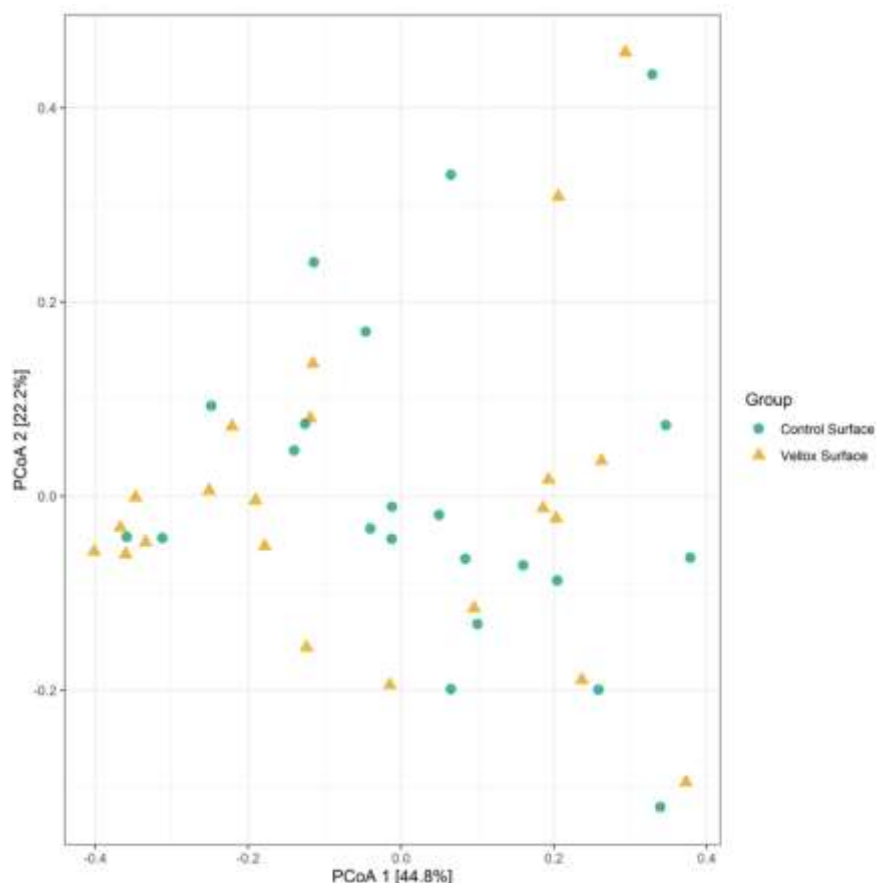


Figura 33-Gráfico do princípio análise das coordenadas principais da composição microbiana de todas as amostras

A interpretação dos dados presentes em gráficos do princípio da análise das coordenadas principais basea-se na premissa que pontos próximos apresentam maior semelhança entre si e que pontos distantes apresentam menor semelhança. Pontos agrupados indica que existe semelhança entre um grande número de amostras. Ao avaliar-se os resultados da Figura 33 pode-se afirmar que a dispersão entre os pontos indica-nos existirem dissimilaridades entre as amostras.

De forma a avaliar se tais dissimilaridades eram estatisticamente significativas procedeu-se à análise dos dados da beta diversidade com recurso ao teste de Adonis (Permanova) que demonstrou não existirem diferenças significativas entre os microbiomas encontrados ($p = 0.3387$) quer na superfície maquinada, quer na superfície Vellox® (Tabela 18).

Tabela 18-Tabela descritiva dos resultados obtidos no teste de Adonis (Permanova); R²- Percentagem de variação

	R²	P value
Vellox® Vs Maquinada	0,0256	0.3387

A abundância relativa refere-se a quão comum ou rara uma OTU é relativa a outras OTUs na mesma comunidade. Nas análises de diversidade beta, a abundância relativa é útil para monitorizar mudanças na população de um táxon entre as amostras. As pontuações de abundância são as contagens de sequências atribuídas a cada OTU.

5.2.2.1 Teste de abundância diferencial

Esta é uma estimativa da dependência da média da variância nos dados de contagem de ensaios de sequenciação de alto rendimento e testes para expressão diferencial com base num modelo usando a distribuição binomial negativa (Love, Huber, & Anders, 2014). A distribuição binomial negativa é uma distribuição de probabilidade discreta do número de sucessos numa sequência de ensaios independentes e de distribuição idêntica de Bernoulli antes que ocorra um número especificado (não aleatório) de falhas. Esta é uma distribuição útil para modelar com base numa contagem (como microbioma), onde as réplicas biológicas são baixas e os dados não são normalmente distribuídos (Bliss & Fisher, 1953).

O DESeq2 foi utilizado para identificar a taxa diferencialmente abundante entre as variáveis do grupo, sendo que não foi detetado qualquer OTU que fosse diferencialmente abundante em ambas as superfícies implantares.

5.2.3 Análise das proporções bacterianas

A análise dos dados das proporções bacterianas (tabelas 6 a 18) consistiu na aplicação de um teste paramétrico (teste t para amostras emparelhadas) que demonstrou não existir diferenças significativas para nenhum dos microorganismos considerados ($p > 0.05$ em todos os casos).

VI. DISCUSSÃO

A presente investigação teve como objetivo a avaliação da adesão bacteriana bem como a relação da mesma com a molhabilidade na superfície implantar Vellox®. Esta superfície resulta de um processamento da superfície implantar através de jateamento de partículas de óxido de alumínio e um duplo condicionamento ácido. Assim, pretendia-se avaliar *in vitro e in vivo* a adesão bacteriana desta superfície bem como as possíveis alterações estruturais que o biofilme bacteriano aderido poderia promover na mesma. Para a realização desta investigação optou-se por utilizar como superfície controlo a superfície maquinada pois esta, para além de ter sido das primeiras a ser comercializada, apresenta um baixo grau de rugosidade. A seleção desta superfície foi feita em conformidade com estudos semelhantes previamente realizados (Annunziata & Guida, 2015; Conserva et al., 2018; Ferreira Ribeiro et al., 2016; Iwaya et al., 2008; Schwarz et al., 2007). Para o estudo *in vivo* a amostra selecionada para esta investigação foram alunos voluntários membros da Comunidade Egas Moniz. Desta forma era possível obter um universo populacional jovem, saudável, padronizando-se assim a ausência de doenças sistémicas, cáries, medicação antibiótica, bem como outros fatores que promovam a alteração dos resultados microbiológicos e microscópicos. Foram selecionados indivíduos com a mesma faixa etária, padrões de higiene oral iguais, estado periodontal saudável (atestados na consulta assistencial de Periodontologia da Clínica Universitária Egas Moniz), fluxo salivar não estimulado e pH semelhante, dispositivos calibrados e em condições iguais para todos os participantes, bem como o manuseamento dos mesmos e dos resultados em câmara de fluxo laminar (garantindo assim um ambiente livre de contaminações) permitem atestar a fiabilidade dos resultados deste estudo (Ferreira Ribeiro et al., 2016).

O período de utilização do dispositivo intra-oral de 48h possibilita a formação do biofilme inicial. Um estudo realizado por Becker et al. (2013) onde foi analisado o biofilme formado nos períodos de 24h e 48h em três superfícies implantares distintas (Maquinadas, SLA e Maquinadas condicionadas) permitiu concluir que existe uma formação de biofilme significativamente maior no período de 48h do que 24h. Estes dados, juntamente com a adaptação de outros protocolos descritos na literatura para investigações semelhantes permitiu-nos definir 48h como o período janela para a utilização do dispositivo. (Avila et al., 2017; Conserva et al., 2018; John, Becker, & Schwarz, 2015; Schwarz et al., 2007).

A análise desta superfície com recurso a microscópio eletrónico de varrimento já se encontra descrita na literatura. Giner et al. (2018) realizou uma investigação onde foi analisada a topografia superficial, a molhabilidade e a composição química de discos de titânio com dois tratamentos de superfície: um com o tratamento de duplo condicionamento ácido (previamente jateado com óxido de alumínio) e uma superfície maquinada. Nesta investigação observou-se que microscopicamente a superfície apresenta relevos e cavidades com dimensões variáveis, estando estas distribuídas aleatoriamente na superfície previamente jateada. Verificou-se também que a superfície maquinada apresenta uma topografia plana com sulcos circulares resultantes do tratamento de superfície (Giner et al., 2018). Os resultados obtidos nesta investigação estão em concordância com os obtidos por Giner et al. (2018). Todas as características referidas anteriormente podem ser visualizadas principalmente em ampliações superiores (2000x e 10000x), sendo que as mesmas características topográficas são iguais às encontradas por Giner et al. (2018) quer na superfície Vellox® quer na superfície maquinada. Na investigação de Giner et al. (2018) citada anteriormente, foi efetuada EDS da superfície implantar. Nesta situação os resultados não estão em concordância com a presente investigação, uma vez que os autores identificaram uma composição onde os elementos predominantes são o oxigénio e o carbono, enquanto na presente investigação o elemento predominante é o titânio. No entanto foi possível identificar a presença de partículas de óxido de alumínio que, e em consonância com o descrito na literatura, são provavelmente provenientes do jateamento e que não foram removidas durante o processo de condicionamento. A ausência de carbono na investigação descrita nesta tese pode ser justificada pela rápida análise dos implantes impedindo assim a contaminação da atmosfera. Tal ausência de contaminação permite ter uma representação mais fiável da composição elementar da superfície Vellox®.

Neste estudo foi efetuado a análise da molhabilidade pelo método da deposição da gota séssil. Nesta investigação, para superfície Vellox® (duplo condicionamento ácido e jateamento de partículas), o valor médio obtido foi de 135° e para superfície maquinada foi de 102°. No estudo de Giner et al. (2018), o valor obtido foi de 110° para a superfície com duplo condicionamento ácido e jateamento e de 70° para a superfície maquinada (Giner et al., 2018). Esta discrepância de valores poderá estar associada a diferentes rugosidades das superfícies uma vez que a rugosidade é uma característica topográfica que influencia a medição dos ângulos de contacto (Frank Rupp et al., 2014). Desta forma é possível classificar ambas as superfícies estudadas nesta investigação como

hidrofóbicas. No entanto os valores do ângulo de contacto da superfície Vellox® estão próximos dos valores padrão para superfícies superhidrofóbicas ($CA > 150^\circ$). Esta propriedade é característica das superfícies tratadas com condicionamento ácido pelo que os valores obtidos nesta investigação estão em consonância com o descrito na literatura (Frank Rupp et al., 2014).

Ao contrário do estudo de Giner et al. (2018) nesta investigação foram utilizados implantes em vez de discos de titânio. Esta opção deve-se ao facto de a macro topografia do implante, como as espiras, não seria totalmente representada nos discos levando assim a uma reprodução pouco fiável do desempenho clínico dos implantes. Um estudo realizado por Naves et al. (2015) concluiu que a parâmetros como a rugosidade e a textura da superfície eram afetados pela macrogeometria do implante. Desta forma a utilização de discos de titânio apenas permite a reprodução, dos parâmetros anteriormente referidos, das zonas planas do implante e não existindo assim uma reprodução tão fiel da situação clínica (Naves et al., 2015). Tendo em conta os dados anteriormente citados optou-se por realizar a presente investigação em implantes em vez de discos de titânio permitindo aumentar a reprodutibilidade das condições clínicas.

Segundo F. Rupp et al. (2018) as irregularidades macroscópicas dos implantes (por exemplo espiras) tornam a medição da molhabilidade alvo de erros. Como forma de avaliar possíveis erros durante a medição da molhabilidade foi selecionada uma zona (Zona A) que correspondia à câmara de retenção óssea do implante. Esta era uma zona plana e sem presença de espiras. Ao analisar os valores obtidos do ângulo de contacto nessa região implantar, observou-se que eram semelhantes aos valores obtidos nas outras duas zonas (Zona B e Zona C) com espiras, pelo que, nesta investigação, as espiras não influenciaram na obtenção dos resultados do ângulo de contacto.

Neste estudo fez-se, pela primeira vez, a caracterização dos microrganismos aderidos à superfície Vellox® tanto *in vitro* como *in vivo*. O protocolo de recolha do biofilme das superfícies implantares foi baseado no protocolo descrito por Ferreira Ribeiro et al. (2016) onde foi avaliado a adesão bacteriana em três superfícies implantares distintas (maquinada, com condicionamento ácido e anodizada). A observação com recurso ao MEV dos implantes estudados nesta investigação, após a aplicação do protocolo de recolha, permitiu aferir a validade deste protocolo de recolha, tendo sido observado uma remoção total do biofilme da superfície implantar. Tal remoção total foi também garantida no estudo de Ferreira Ribeiro et al. (2016).

A utilização de controlos contaminados *in vitro* permitiu avaliar a especificidade e a sensibilidade da análise microbiómica. Na observação dos implantes de controlo deteta-se a presença de bactérias com morfologia bacilar, cocos e uma levedura em processo de divisão. Estas imagens revelaram ainda predominância de estruturas bacilares permitem-nos garantir que a contaminação decorreu na totalidade, estando presentes pelo menos, as duas bactérias com morfologia bacilar resultantes da contaminação *in vitro* (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Numa revisão sistemática da literatura Krasowska & Sigler (2014) afirmaram que as bactérias Gram negativas apresentam maior adesão bacteriana às superfícies e que o carácter hidrofóbico das bactérias aumenta a adesão das mesmas. Deste modo, e uma vez que as duas bactérias com morfologia bacilar são as únicas bactérias hidrofóbicas e gram negativas, pode-se explicar o motivo para existir predominância das mesmas na análise microscópica e microbiológica (Krasowska & Sigler, 2014). Durante a análise microbiológica dos implantes de controlo foi possível detetar *Streptococcus infantis*, em pequenas quantidades. No entanto esta estirpe bacteriana não foi utilizada na contaminação *in vitro*. Este erro na identificação poderá ser resultante da semelhança entre esta espécie e a *Streptococcus mitis* (utilizada na contaminação *in vitro* dos implantes de controlo). Este tipo de erro encontra-se descrito na literatura num estudo efetuado por Jenkins et al. (2012) onde foi demonstrado a semelhança entre estas duas estirpes bacterianas durante o processo de sequenciação dos genes da porção 16S do ARN ribossomal. A ausência da deteção da levedura presente nos implantes de controlo deveu-se ao facto de apenas terem sido sequenciados genes 16S ARN bacteriano. Os resultados da análise microscópica e microbiológica dos controlos revelam uma baixa sensibilidade (não foram detetados todos os microrganismos adicionados) e especificidade (foram detetados microrganismos que não foram adicionados) da análise microbiómica.

Foram identificadas um total de 34 estirpes bacterianas presentes nos implantes contaminados *in vivo* sendo estas: *Streptococcus infantis*, *Veillonella parvula*, *Rothia mucilaginosa*, *Veillonella dispar*, *Haemophilus parainfluenza*, *Rothia dentocariosa*, *Capnocytophaga ochracea*, *Prevotella nanceiensis*, *Escherichia coli*, *Prevotella melaninogeni*, *Haemophilus influenzae*, *Prevotella copri*, *Neisseria cinerea*, *Gemella* spp., *Abiotrophia* spp., *Actinomyces* spp., *Bacterioides* spp., *Brucellaceae* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Enterococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Granulicatella* spp., *Lautropia* spp., *Leptotrichia* spp., *Neisseria* spp., *Neisseriaceae* spp.,

Pasteurellaceae spp., *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Veillonellaceae spp.*, *Weeksellaceae spp.*, *Kingella spp.*

As espécies em maior proporção foram *Streptococcus infantis*, *Neisseria cinerea* e *Haemophilus parainfluenza*. Todas estas já se encontram descritas em estudos anteriores na cavidade oral, no entanto, a presença destas espécies associadas a implantes cujo tratamento de superfície seja igual ao presente neste estudo, não se encontra na literatura atual.

A localização dos dispositivos intra-orais é determinante na diversidade de espécies bacterianas existentes nas superfícies estudadas. Segundo Welch et al. (2019) espécies como *Streptococcus spp.*, *Granulicatella spp.*, *Prevotella spp.*, *Haemophilus spp.* e *Veillonella spp.* são bactérias descritas como mais abundantes na região da gengiva queratinizada (Welch et al., 2019). A análise microbiológica dos implantes presentes nos dispositivos intra-orais detetou todas as bactérias referidas anteriormente pelo que os resultados obtidos encontram-se em conformidade com os resultados descritos por Welch et al. (2019) uma vez que o dispositivo localizava-se junto da gengiva queratinizada na face vestibular do maxilar inferior .

Espécies bacterianas como *Veillonella parvula* e *Streptococcus spp.* foram detetadas nas superfícies implantares estudadas nesta investigação. Estas são consideradas colonizadores primários da superfície implantar, pertencendo ao complexo amarelo e roxo do Complexo de Socranski e sendo responsáveis pela formação o biofilme inicial, componente essencial para o desenvolvimento do biofilme maduro (Teles, Teles, Frias-Lopez, Paster, & Haffajee, 2013). Na superfície implantar dos implantes estudados foi ainda possível identificar bactérias como *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Capnocytophaga ochracea*, pertencentes ao complexo verde, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, pertencentes ao complexo laranja e *Actinomyces spp.* pertencentes ao complexo azul e sendo comuns na cavidade oral.

Da mesma forma, a presença de bactérias como *Rothia mucilaginosa*, *Rothia dentocariosa*, *Neisseria cinerea* e *Haemophilus influenzae* nas superfícies implantares estudadas é consistente com o presente na literatura, estando estas descritas como presentes em bolsas peri-implantares saudáveis (D. Daubert, Pozhitkov, McLean, & Kotsakis, 2018; Pokrowiecki et al., 2017; Sanz-Martin et al., 2017).

Num estudo realizado por Sanz-Martin et al. (2017) com o objetivo de caracterizar o microbioma presente em zonas com implantes saudáveis e zonas com peri-implantites, concluiu a presença de bactérias peri-implanto patogénicas em zonas de implantes

saudáveis como a *Veillonella parvula*, *Streptococcus spp* e *Actinomyces spp*. Desta forma é assim possível justificar a existência deste tipo de bactérias nos pacientes periodontalmente saudáveis da presente investigação (Sanz-Martin et al., 2017).

Um estudo de Diaz et al. (2016), cujo objetivo era caracterizar o biofilme inicial formado no esmalte conclui que após as primeiras 24h os colonizadores primários são seguidos pela adesão de bactérias como a *Streptococcus infantis*, *Neisseria spp* e *Gemella spp*. Tal estudo pode justificar a presença destas bactérias na superfície dos implantes estudados. É de notar que esta extrapolação só é possível devido à existência do estudo de Al-Ahmad et al. (2010) que conclui que a formação do biofilme sobre as superfícies implantares de titânio e de zircónica ocorre de maneira semelhante no esmalte dentário (Al-Ahmad et al., 2010; Diaz et al., 2006).

Na análise microbiana, detetou-se bactérias como a *Prevotella melaninogeni*. Num estudo de Augthun M & G. (1997), onde foi analisado microbiologicamente defeitos ósseos peri-implantares foi possível detetar a existência da *Prevotella melaninogeni*, estando esta assim também associada à doença peri-implantar (Augthun M & G., 1997).

Bactérias como *Abiotrophia spp* e *Granulicatella spp*. encontram-se igualmente descritas na cavidade oral como sendo parte integrante da flora comensal oral (Mark Welch et al., 2019). No entanto, bactérias como a *Prevotella copri* não se encontram relatadas na cavidade oral sendo estas bactérias do microbioma intestinal (Moreno, 2015).

A presença de *Weeksellaceae spp*. encontra-se previamente descrita na cavidade oral. Esta desempenha papel como marcador tumoral, estando associado ao carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço (Chattopadhyay, Verma, & Panda, 2019).

A *Kingella spp*. encontra-se igualmente descrita na literatura como sendo parte constituinte da flora comensal oral, estando ainda relatado a sua influência na diminuição do risco de carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço (Hayes et al., 2018; Kumar, Mason, Brooker, & O'Brien, 2012; Mark Welch et al., 2019).

É relevante frisar a predominância de bactérias Gram-negativas sobre as bactérias Gram-positivas. Tais dados estão em concordância com o que descrito por Kumar et al. (2012) que ao caracterizar o perfil bacteriano de implantes saudáveis e afetados por peri-implantite, determinou uma maior predominância de bactérias gram-negativas nos implantes saudáveis (Kumar et al., 2012)

No presente estudo foi possível verificar que a diversidade bacteriana presente foi semelhante nos dois tipos de implante. Por outras palavras foi possível verificar que a composição bacteriana em ambas as superfícies estudadas foi a mesma, sendo esta

conclusão fundamentada com a ausência de diferença estatisticamente significativas da beta diversidade e proporções bacterianas. Estes resultados contrastam com o que se encontra descrito na literatura, em que parece haver uma maior adesão bacteriana a superfícies implantares irregulares do que a superfícies planas. Desta forma é possível afirmar que a *in vivo* e *in vitro* a colonização bacteriana não é influenciada pelas características topográficas ou propriedades físico-químicas da superfície Vellox®. Este resultado vem corroborar estudo prévios como Ferreira Ribeiro et al. (2016) que conclui que a rugosidade e a microtopografia da superfície implantar não estimulava a formação do biofilme inicial em superfícies de titânio com diferentes tratamentos de superfície.

A ausência de alterações na estrutura microscópica de ambas as superfícies implantares deve-se ao facto de este estudo ter sido realizado durante um período curto. Segundo Souza et al. (2015), as primeiras alterações estruturais da superfície implantar só começam a ser observadas após 21 dias de exposição (Souza et al., 2015).

A análise do MEV aos implantes contaminados *in vivo* e sem o protocolo de remoção permite-nos afirmar que existiu uma colonização da superfície de forma uniforme. Esta colonização deu-se de igual forma entre as duas superfícies, aspeto esse previamente observado nos controlos da adesão *in vitro*. É de notar que a adesão bacteriana a nível apical do implante pode ser desprezível uma vez que, em contexto clínico, este nunca estará exposto à cavidade oral estando introduzido no osso.

A facilidade de remoção do biofilme implantar deverá ser abordada em estudos futuros de forma a se poder entender o mecanismo de formação do biofilme cronologicamente. Para tal o autor propõe a realização de estudos onde seja efetuado protocolos de remoção em implantes contidos na cavidade oral por períodos de tempo distintos (por exemplo remoção do implante e análise microbiológica ao fim de um período de 24h, 48h, 72h, 5 dias, 7 dias e 14 dias).

As principais limitações deste estudo são enunciadas a seguir. O facto de se tratar de um estudo por um período de 48h implica um comprometimento do voluntário para a sua utilização, não sendo possível uma vigilância permanente do mesmo para o cumprimento do protocolo de utilização. Desta forma, a presença de valores baixos de leituras em alguns indivíduos indica-nos uma eventual má utilização do dispositivo intra-oral uma vez que o reduzido número de leituras surgiu em ambos os implantes do mesmo dispositivo intra-oral, ou seja, do mesmo indivíduo. Adicionalmente, durante este período, existe o risco de contaminação por parte do voluntário durante a sua utilização. Para reduzir o impacto destas limitações, os voluntários foram instruídos para a utilização

adequada dos dispositivos. Em acréscimo a esta instrução de utilização o autor propõe a disponibilização ao voluntário de uma tabela cronológica onde o mesmo deve registar os períodos (e a sua duração) em que remove o dispositivo intra-oral, como forma a permitir o controlo aquando da análise de dados. A análise microbiológica não permitiu uma avaliação quantitativa das bactérias presentes em cada superfície implantar pelo que os resultados obtidos podem ser em parte determinados pela diferente taxa de colonização bacteriana em cada indivíduo.

É ainda denotar que a técnica de fixação do implante ao dispositivo intra-oral usado obstrui a exposição do colo no implante ao meio da cavidade oral. A observação do mesmo é fundamental para caracterizar e avaliar a adesão microbiana aos implantes pois em situação de doença peri-implantar tal região do implante é a primeira a ser exposta à cavidade oral. Como forma de minimizar esta limitação o autor propõe a utilização, em estudos subsequentes, de uma peça intermediária que permita a exposição do colo do implante a fim de este poder ser analisado.

Para além das formas de minimizar as limitações referidas anteriormente, o autor propõe duas medidas adicionais para ser realizado em estudos futuros:

1. Disponibilização ao voluntário de um kit de higienização (escova + pasta dentífrica) para que o protocolo de higienização em todos os voluntários seja semelhante, bem como uma tabela de registo dos momentos da escovagem dentária;
2. Utilização de um *software* (por exemplo OPTICA®) para quantificar em unidades superficiais os microorganismos detetados nas observações com o MEV;
3. A presença de quatro implantes (dois implantes com superfície Vellox® e dois implantes com superfície maquinada) em vez de dois em todos os dispositivos intra-orais, permitindo assim um maior controlo sobre as análises efetuadas aos mesmo.

VII. CONCLUSÃO

Tendo em conta todas as limitações, este estudo inédito permite concluir:

1. A aplicação do duplo condicionamento ácido em acréscimo ao jateamento com partículas de óxido de alumínio diminui a molhabilidade da superfície, sendo esta diminuição representada pelo aumento do ângulo de contacto;
2. A exposição da superfície implantar Vellox® e da superfície maquinada à cavidade oral por um período de 48h durante a formação do biofilme inicial não produz alterações microestruturais na mesma;
3. A colonização bacteriana decorreu da mesma forma na superfície Vellox® e na superfície maquinada (controlo) tendo um microbioma constituinte semelhante;
4. A microtopografia e a molhabilidade não estimulam a formação do biofilme inicial nas superfícies de titânio com diferentes tratamentos de superfícies.

Perspetivas futuras:

- Testes quantitativos semelhantes *in vivo* para avaliar quantitativamente o número de bactérias depositadas na superfície Vellox®;
- Análise de outras características da superfície como por exemplo a rugosidade;
- Testes *in vivo* com avaliação da deposição do biofilme com recurso a outras técnicas como a hibridação *in situ* fluorescente ou a microscopia confocal;
- Caracterização histológica e comparação do processo de osteointegração da superfície implantar Vellox® com outras superfícies implantares;
- Caracterização e comparação do microbioma formado entre superfícies implantares com duplo condicionamento ácido e jateamento e superfícies implantares com um único condicionamento ácido e jateamento;
- Avaliação microscópica da superfície Vellox® após aplicação dos protocolos de remoção do biofilme em vigor para o tratamento das peri-implantites;
- Avaliação microscópica da superfície implantar Vellox® e de outras superfícies implantares submetidas ao ambiente da cavidade oral: Estudo *in vivo*

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, C. M. (2014). *A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments*. 8, 50–55.
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., ... Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Faust, J., Bächle, M., Follo, M., Wolkewitz, M., ... Kohal, R. (2010). Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95(1), 101–109. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31688>
- Almas, K., Smith, S., & Kutkut, A. (2019). What is the Best Micro and Macro Dental Implant Topography? *Dental Clinics of North America*, 63(3), 447–460. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.02.010>
- Anderson, M. J., & Walsh, D. C. I. (2017). *PERMANOVA , ANOSIM , and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions : What null hypothesis are you testing ? Author (s) : Marti J . Anderson and Daniel C . I . Walsh Published by : Wiley on behalf of the Ecological Society of America Stable*. 83(4), 557–574.
- Annunziata, M., & Guida, L. (2015). The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. *Frontiers of Oral Biology*, 17, 62–77. <https://doi.org/10.1159/000381694>
- Araújo, E. A., De Andrade, N. J., De Carvalho, A. F., Ramos, A. M., De Sá Silva, C. A., & Da Silva, L. H. M. (2010). Colloidal aspects of bacterial adhesion. *Quimica Nova*, 33(9), 1940–1948. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000900022>
- Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2018). Peri-implant health. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(August 2017), S230–S236. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12952>
- Arnhart, C., Dvorak, G., Trefil, C., Huber, C., Watzek, G., & Zechner, W. (2013). Impact of implant surface topography: A clinical study with a mean functional loading time of 85 months. *Clinical Oral Implants Research*, 24(9), 1049–1054. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02498.x>
- Augthun M, & G., C. (1997). Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants*.
- Avila, E. D., Vergani, C. E., Mollo Junior, F. A., Junior, M. J., Shi, W., & Lux, R.

- (2017). Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 118(4), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2017.01.010>
- Bermejo, P., Sánchez, M. C., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz Alonso, M. (2019). Biofilm formation on dental implants with different surface micro-topography: An in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, (March), 1–10. <https://doi.org/10.1111/clr.13455>
- Bliss, C. I., & Fisher, R. A. (1953). *Fitting the Negative Binomial Distribution to Biological Data Author (s): C . I . Bliss and R . A . Fisher Reviewed work (s): Published by : International Biometric Society Stable URL : http://www.jstor.org/stable/3001850 . 9(2), 176–200.*
- Block, M. S. (2018). Dental Implants: The Last 100 Years. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 76(1), 11–26. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.08.045>
- Bosshardt, D. D., Chappuis, V., & Buser, D. (2017). Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontology 2000*, 73(1), 22–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12179>
- Branemark, P.-I., Chien, S., Grondahl, H., & Robinson, K. (2006). *The Osseointegration Book: From Calvarium to Calcaneus* (First Edit). Chicago: Quintessence Pub Co;
- Branemark, P. I. (1983). Osseointegration and its experimental background. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 50(3), 399–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(83\)80101-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(83)80101-2)
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Cervino, G., Fiorillo, L., Iannello, G., Santonocito, D., Risitano, G., & Cicciù, M. (2019). Sandblasted and acid etched titanium dental implant surfaces systematic review and confocal microscopy evaluation. *Materials*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/ma12111763>
- Chattopadhyay, I., Verma, M., & Panda, M. (2019). Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18, 153303381986735. <https://doi.org/10.1177/1533033819867354>
- Conserva, E., Generali, L., Bandieri, A., Cavani, F., Borghi, F., & Consolo, U. (2018).

- Plaque accumulation on titanium disks with different surface treatments: an in vivo investigation. *Odontology*, 106(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0317-2>
- COSGAREA, R., SCULEAN, A., SHIBLI, J. A., & SALVI, G. E. (2019). Prevalence of peri-implant diseases – a critical review on the current evidence. *Brazilian Oral Research*, 33(suppl 1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0063>
- Damiati, L., Eales, M. G., Nobbs, A. H., Su, B., Tsimbouri, P. M., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2018). Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *Journal of Tissue Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1177/2041731418790694>
- Daubert, D. M., & Weinstein, B. F. (2019). Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontology 2000*, 81(1), 29–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12280>
- Daubert, D., Pozhitkov, A., McLean, J., & Kotsakis, G. (2018). Titanium as a modifier of the peri-implant microbiome structure. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 20(6), 945–953. <https://doi.org/10.1111/cid.12676>
- De Bruyn, H., Christiaens, V., Doornewaard, R., Jacobsson, M., Cosyn, J., Jacquet, W., & Vervaeke, S. (2017). Implant surface roughness and patient factors on long-term peri-implant bone loss. *Periodontology 2000*, 73(1), 218–227. <https://doi.org/10.1111/prd.12177>
- Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., & Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2837–2848. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006>
- Dreyer, H., Grischke, J., Tiede, C., Eberhard, J., Schweitzer, A., Toikkanen, S. E., ... Stiesch, M. (2018). Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 53(5), 657–681. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>
- Ferenc, K. (2019). *Ö S S Z E F O G L A L Ó K Ö Z L E M É N Y A fogászati implantátumok csontbeépülését befolyásoló „ klasszikus ” tényező "k változásai az elmúlt évtizedekben.* 1455–1463. <https://doi.org/10.1556/650.2019.31503>
- Ferreira Ribeiro, C., Cogo-Müller, K., Franco, G. C., Silva-Concílio, L. R., Sampaio Campos, M., De Mello Rode, S., & Claro Neves, A. C. (2016). Initial oral biofilm

- formation on titanium implants with different surface treatments: An in vivo study. *Archives of Oral Biology*, 69, 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.006>
- Frédéric, L. J., Michel, B., & Selena, T. (2018). Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials*, 11(10), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ma11101802>
- Fukushima, A., Mayanagi, G., Nakajo, K., Sasaki, K., & Takahashi, N. (2014). Microbiologically induced corrosive properties of the titanium surface. *Journal of Dental Research*, 93(5), 525–529. <https://doi.org/10.1177/0022034514524782>
- G. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman, K., ... S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(March), S1–S8.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Giner, L., Mercadé, M., Torrent, S., Punset, M., Pérez, R. A., Delgado, L. M., & Gil, F. J. (2018). Double acid etching treatment of dental implants for enhanced biological properties. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, 16(2), 83–89. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000376>
- Goldstein, J., Newbury, D., Michael, J., Ritchie, N., Scott, J. H., & Joy, D. (2017). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Fourth).
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
- Gupta, S., Dahiya, V., & Shukla, P. (2014). Surface topography of dental implants: A review. *Journal of Dental Implants*, 4(1), 66. <https://doi.org/10.4103/0974-6781.131009>
- Hayes, R. B., Ahn, J., Fan, X., Peters, B. A., Ma, Y., Yang, L., ... Pei, Z. (2018). Association of oral microbiome with risk for incident head and neck squamous cell cancer. *JAMA Oncology*, 4(3), 358–365.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4777>
- Heitz-mayfield, L. J. A., & Salvi, G. E. (2018). *Peri-implant mucositis*. 89(September 2017), 257–266. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0488>
- Hong, D. G. K., & Oh, J. (2017). Recent advances in dental implants. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, 39(1). <https://doi.org/10.1186/s40902-017-0132-2>
- Hotchkiss, K. M., Ayad, N. B., Hyzy, S. L., Boyan, B. D., & Olivares-Navarrete, R.

- (2017). Dental implant surface chemistry and energy alter macrophage activation in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, 28(4), 414–423.
<https://doi.org/10.1111/clr.12814>
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435–444. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.16140>
- Ionescu, A. C., Brambilla, E., Azzola, F., Ottobelli, M., Pellegrini, G., & Francetti, L. A. (2018). Laser microtextured titanium implant surfaces reduce in vitro and in situ oral biofilm formation. *PLoS ONE*, 13(9), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202262>
- Iwaya, Y., Machigashira, M., Kanbara, K., Miyamoto, M., Noguchi, K., Izumi, Y., & Ban, S. (2008). Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium. *Dental Materials Journal*, 27(3), 415–421. <https://doi.org/10.4012/dmj.27.415>
- Jemat, A., Ghazali, M. J., Razali, M., & Otsuka, Y. (2015). Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed Research International*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/791725>
- Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., McHugh, T. D., ... Kibbler, C. C. (2012). Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: Comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), 483–488.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.030387-0>
- Jenny, G., Jauernik, J., Bierbaum, S., Bigler, M., & Grätz, K. W. (2016). A systematic review and meta-analysis on the influence of biological implant surface coatings on periimplant bone formation This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting , typesetting. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 1–28.
- John, G., Becker, J., & Schwarz, F. (2015). Modified Implant Surface with Slower and Less Initial Biofilm Formation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 17(3), 461–468. <https://doi.org/10.1111/cid.12140>
- Kirmanidou, Y., Sidira, M., Drosou, M. E., Bennani, V., Bakopoulou, A., Tsouknidas, A., ... Michalakis, K. (2016). New Ti-Alloys and Surface Modifications to Improve the Mechanical Properties and the Biological Response to Orthopedic and Dental Implants: A Review. *BioMed Research International*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/2908570>
- Krasowska, A., & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what

- does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(AUG), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>
- Kumar, P. S., Mason, M. R., Brooker, M. R., & O'Brien, K. (2012). Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(5), 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>
- Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (sixth). West Sussex: Wiley Blackwell.
- Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mahajan, A., Singh, B., Kashyap, D., Kumar, A., & Mahajan, P. (2013). Interspecies communication and periodontal disease. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/765434>
- Mark Welch, J. L., Dewhirst, F. E., & Borisy, G. G. (2019). Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 335–358. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062503>
- Marotti, J., Gatzweiler, B., Wolfart, M., Sasse, M., Kern, M., & Wolfart, S. (2018). Implant Placement under Existing Removable Dental Prostheses and the Effect on Follow-Up and Prosthetic Maintenance. *Journal of Prosthodontics*, 28(2), e752–e763. <https://doi.org/10.1111/jopr.12943>
- Mavrogenis, A. F., Dimitriou, R., Parvizi, J., & Babis, G. C. (2009). Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 9(2), 61–71.
- Moreno, J. (2015). Prevootella copri and the microbial pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Reumatologia Clinica*, 11(2), 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.11.001>
- Naves, M., Menezes, H., Magalhães, D., Ferreira, J., Ribeiro, S., de Mello, J., & Costa, H. (2015). Effect of Macrogeometry on the Surface Topography of Dental Implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 30(4), 789–799. <https://doi.org/10.11607/jomi.3934>
- Park, K. H., Heo, S. J., Koak, J. Y., Kim, S. K., Lee, J. B., Kim, S. H., & Lim, Y. J.

- (2007). Osseointegration of anodized titanium implants under different current voltages: A rabbit study. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34(7), 517–527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2006.01688.x>
- Persson, G. R., & Renvert, S. (2014). Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 783–793. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>
- Peto, G., Karacs, A., Pászti, Z., Guzzi, L., Divinyi, T., & Joób, A. (2002). Surface treatment of screw shaped titanium dental implants by high intensity laser pulses. *Applied Surface Science*, 186(1–4), 7–13. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00769-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00769-3)
- Ploux, L., Ponche, A., & Anselme, K. (2010). Role of the Material and Cell Wall Properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24, 2165–2201. <https://doi.org/10.1163/016942410X511079>
- Pokrowiecki, R., Mielczarek, A., Zaręba, T., & Tyski, S. (2017). Oral microbiome and peri-implant diseases: Where are we now? *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 13, 1529–1542. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S139795>
- Rupp, F., Liang, L., Geis-Gerstorfer, J., Scheideler, L., & Hüttig, F. (2018). Surface characteristics of dental implants: A review. *Dental Materials*, 34(1), 40–57. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.09.007>
- Rupp, Frank, Gittens, R. A., Scheideler, L., Marmur, A., Boyan, B. D., Schwartz, Z., & Geis-Gerstorfer, J. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. *Acta Biomaterialia*, 10(7), 2894–2906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>
- Salvi, G. E., Cosgarea, R., & Sculean, A. (2017). Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. *Journal of Dental Research*, 96(1), 31–37. <https://doi.org/10.1177/0022034516667484>
- Sanz-Martin, I., J, D.-H., RP, T., M, P., GN, B., CH, H., ... FRF, T. (2017). Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina Sequencing. *J Clin Periodontol 2000*. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12788>
- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H.-L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of Periodontology*, 89(September 2017), 267–290. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>
- Schwarz, F., Sculean, A., Wieland, M., Horn, N., Nuesry, E., Bube, C., & Becker, J. (2007). Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces

- on initial supragingival plaque biofilm Formation. A pilot study. *Mund - Kiefer - Und Gesichtschirurgie*, 11(6), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s10006-007-0079-z>
- Shemtov-Yona, K., & Rittel, D. (2015). An Overview of the Mechanical Integrity of Dental Implants. *BioMed Research International*, 2015, 2–10. <https://doi.org/10.1155/2015/547384>
- Shibli, J. A., Melo, L., Ferrari, D. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., & Feres, M. (2008). Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implants Research*, 19(10), 975–982. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x>
- SINGH, A. V. (2013). *Clinical Implantology* (First; Elsevier, ed.). New Delhi.
- Smeets, R., Stadlinger, B., Schwarz, F., Beck-Broichsitter, B., Jung, O., Precht, C., ... Ebker, T. (2016). Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6285620>
- Socransky, S. ., Haffaiee, A. ., Cugini, M. ., Smith, C., & Kent Jr., R. . (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 134–144. <https://doi.org/0.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Souza, J. C. M., Henriques, M., Teughels, W., Ponthiaux, P., Celis, J. P., & Rocha, L. A. (2015). Wear and Corrosion Interactions on Titanium in Oral Environment: Literature Review. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 1(2). <https://doi.org/10.1007/s40735-015-0013-0>
- Souza, J., Cury, J., Ricomini Filho, A., Feres, M., Faveri, M. de, & Barão, V. (2019). Effect of sucrose on biofilm formed in situ on titanium material. *Journal of Periodontology*, 90(2), 141–148. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0219>
- Teles, R., Teles, F., Frias-Lopez, J., Paster, B., & Haffajee, A. (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62(1), 95–162. <https://doi.org/10.1111/prd.12010>
- Wennerberg, A., Albrektsson, T., Andersson, B., & Krol, J. J. (1995). A histomorphometric study of screw-shaped and removal torque titanium implants with three different surface topographies. *Clinical Oral Implants Research*, Vol. 6, pp. 24–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1995.060103.x>
- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity Published by : International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Stable URL :

- <http://www.jstor.org/stable/1218190> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log. *Taxon*, 21(2), 213–251.
- Wirth, J., Tahriri, M., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Dentino, A. R., & Tayebi, L. (2017). Surface modification of dental implants. In *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00006-2>
- Yoshinari, M., Oda, Y., Kato, T., & Okuda, K. (2001). Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials*, 22(14), 2043–2048. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00392-6)
- Zhang, Q., Qin, X. Y. a., Jiang, W. P. en., Zheng, H., Xu, X. L. i., & Chen, F. (2015). Comparison of Subgingival and Peri-implant Microbiome in Chronic Periodontitis. *The Chinese Journal of Dental Research : The Official Journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)*, 18(3), 155–162.

ANEXO I

Tipo Implante	Número do implante	Número da gota	Zona da Gota	Ângulo de contacto	Tipo de gota	Temperatura
1	1	1	A	128,42	SD	21,50
1	1	2	A	121,88	SD	21,50
1	1	3	A	137,27	SD	21,50
1	1	4	A	135,18	SD	21,50
1	1	5	B	156,28	SD	21,60
1	1	6	B	145,70	SD	21,60
1	1	7	B	148,70	SD	21,60
1	1	8	B	149,06	SD	21,60
1	1	9	C	120,53	SD	21,80
1	1	10	C	124,00	SD	22,00
1	1	11	C	121,32	SD	21,64
1	1	12	C	130,03	SD	21,90
1	2	1	A	118,58	SD	21,50
1	2	2	A	126,32	SD	21,50
1	2	3	A	113,23	SD	21,50
1	2	4	A	131,17	SD	21,50
1	2	5	B	145,98	SD	21,60
1	2	6	B	141,40	SD	21,60
1	2	7	B	136,59	SD	21,60
1	2	8	B	149,64	SD	21,60
1	2	9	C	134,25	SD	22,00
1	2	10	C	135,93	SD	21,84
1	2	11	C	123,03	SD	22,00
1	2	12	C	137,56	SD	22,00
1	3	1	A	120,33	SD	21,50
1	3	2	A	111,68	SD	21,40
1	3	3	A	145,07	SD	21,40
1	3	4	A	146,62	SD	21,50
1	3	5	B	165,32	SD	21,40
1	3	6	B	141,00	SD	21,50
1	3	7	B	161,03	SD	21,50
1	3	8	B	152,92	SD	21,40
1	3	9	C	138,95	SD	21,40
1	3	10	C	128,37	SD	21,50
1	3	11	C	135,03	SD	21,50
1	3	12	C	135,93	SD	21,50
1	4	1	A	123,61	SD	21,40
1	4	2	A	130,97	SD	21,90
1	4	3	A	117,69	SD	21,90
1	4	4	A	120,85	SD	22,20

TABELA DOS VALORES DO ÂNGULO DE CONTACTO; Tipo de implante: 1-Vellox®/2-Maquinado; Número do implante avaliado; Tipo da gota: SD- Sessil Drop (Gota séssil)

Estudo Piloto: Caracterização in vivo do microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio

Tipo Implante	Número do implante	Número da gota	Zona da Gota	Ângulo de contacto	Tipo de gota	Temperatura
1	4	5	B	156,98	SD	21,4
1	4	6	B	153,56	SD	21,9
1	4	7	B	140,02	SD	22,2
1	4	8	B	138,15	SD	22,3
1	4	9	C	137,16	SD	21,5
1	4	10	C	131,33	SD	22,1
1	4	11	C	135,15	SD	22,06
1	4	12	C	130,14	SD	22,3
2	5	1	A	72,28	SD	22,2
2	5	2	A	47,08	SD	22,1
2	5	3	A	74,2	SD	22,2
2	5	4	A	77,05	SD	22,1
2	5	5	B	142,43	SD	22,1
2	5	6	B	136,33	SD	22,2
2	5	7	B	137,81	SD	22,1
2	5	8	B	133,54	SD	22,1
2	5	9	C	105,07	SD	22,1
2	5	10	C	93,22	SD	22,1
2	5	11	C	113,66	SD	22,1
2	5	12	C	93,06	SD	22
2	6	1	A	79,78	SD	22,2
2	6	2	A	92,46	SD	22,2
2	6	3	A	67,38	SD	22,2
2	6	4	A	72,59	SD	21,82
2	6	5	B	144,16	SD	21,82
2	6	6	B	144,1	SD	22,2
2	6	7	B	141,19	SD	22,1
2	6	8	B	134,63	SD	22,1
2	6	9	C	97,44	SD	22
2	6	10	C	88,37	SD	22
2	6	11	C	79,49	SD	22
2	6	12	C	90,36	SD	22
2	7	1	A	73,03	SD	21,5
2	7	2	A	40,65	SD	21,9
2	7	3	A	106,55	SD	22
2	7	4	A	62,74	SD	22,1
2	7	5	B	139,06	SD	21,5

TABELA DOS VALORES DO ÂNGULO DE CONTACTO; Tipo de implante: 1-Velox®/2-Maquinado; Número do implante avaliado; Tipo da gota: SD- Sessil Drop (Gota sésil)

Tipo Implante	Número do implante	Número da gota	Zona da Gota	Ângulo de contacto	Tipo de gota	Temperatura
2	7	6	B	118,69	SD	22,54
2	7	7	B	142,27	SD	22
2	7	8	B	154,11	SD	22,1
2	7	9	C	98,42	SD	21,5
2	7	10	C	128,5	SD	21,9
2	7	11	C	87,15	SD	22
2	7	12	C	77,95	SD	22,1
2	8	1	A	66,89	SD	21,4
2	8	2	A	73,58	SD	21,4
2	8	3	A	75,26	SD	21,4
2	8	4	A	44,4	SD	21,4
2	8	5	B	138,38	SD	21,5
2	8	6	B	48,09	SD	22,14
2	8	7	B	156,54	SD	21,5
2	8	8	B	112,8	SD	21,4
2	8	9	C	83,65	SD	21,5
2	8	10	C	146,48	SD	21,4
2	8	11	C	147,75	SD	21,5
2	8	12	C	146,03	SD	21,5

TABELA DOS VALORES DO ÂNGULO DE CONTACTO; Tipo de implante: 1-Vellox®/2-Maquinado; Número do implante avaliado; Tipo da gota: SD- Sessil Drop (Gota séssil)

ANEXO II

Superfície Indivíduos	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		<i>Neisseria cinerea</i>		<i>Veillonella dispar</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Gemella não classificadas</i>		<i>Granulicatella não classificada</i>		<i>Pasteurellaceae não classificadas</i>		<i>Prevotella copri</i>	
	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada
1	0,1606	0,1078	0,3632	0,2466	0,0015	0,0684	0,0131	0,0378	0,0055	0,0034	0,0110	0,0017	0,0040	0,0054	0,0000	0,0015
2	0,0120	0,0576	0,0700	0,0352	0,0005	0,0008	0,0011	0,0032	0,0120	0,0088	0,0093	0,0080	0,0000	0,0016	0,0000	0,0064
3	0,3854	0,3704	0,0629	0,3446	0,1051	0,0069	0,0007	0,0012	0,0061	0,0018	0,0031	0,0017	0,0066	0,0074	0,0016	0,0018
4	0,0851	0,2118	0,4293	0,4251	0,0164	0,0168	0,0227	0,0101	0,0119	0,0048	0,0115	0,0138	0,0088	0,0144	0,0015	0,0010
6	0,0476	0,1564	0,3375	0,2412	0,0608	0,0071	0,0122	0,0065	0,0269	0,0171	0,0081	0,0043	0,0032	0,0014	0,0006	0,0009
7	0,0925	0,1837	0,1069	0,3180	0,0086	0,0012	0,0010	0,0025	0,0292	0,0437	0,0208	0,0092	0,0074	0,0067	0,0031	0,0010
10	0,2269	0,3469	0,0278	0,0169	0,1135	0,0639	0,0412	0,0133	0,0081	0,0018	0,0005	0,0000	0,0008	0,0000	0,0017	0,0133
11	0,0741	0,0472	0,7845	0,7500	0,0020	0,0019	0,0111	0,0130	0,0023	0,0056	0,0061	0,0028	0,0116	0,0074	0,0020	0,0120
12	0,1639	0,1339	0,2207	0,0763	0,0233	0,0187	0,0552	0,0587	0,0662	0,0642	0,0309	0,0412	0,0030	0,0006	0,0037	0,0026
13	0,0944	0,1922	0,0008	0,0046	0,0013	0,0096	0,0186	0,0630	0,0196	0,0278	0,0062	0,0080	0,0008	0,0016	0,0008	0,0018
16	0,1215	0,1508	0,1215	0,2150	0,2029	0,0816	0,0074	0,0777	0,0051	0,0054	0,0087	0,0064	0,0015	0,0013	0,0027	0,0013
17	0,0975	0,0448	0,0975	0,3476	0,1524	0,0545	0,0189	0,0205	0,0198	0,0072	0,0039	0,0065	0,0024	0,0040	0,0022	0,0005
18	0,7784	0,6986	0,7784	0,1139	0,0011	0,0117	0,0001	0,0031	0,0001	0,0003	0,0004	0,0007	0,0033	0,0028	0,0018	0,0008
19	0,0260	0,1516	0,0260	0,0422	0,0399	0,0277	0,0195	0,1027	0,0243	0,0222	0,0128	0,0156	0,0025	0,0057	0,0025	0,0020
20	0,2225	0,5680	0,2225	0,0411	0,0356	0,0011	0,0281	0,0174	0,0024	0,0228	0,0068	0,0032	0,0152	0,0086	0,0023	0,0011
21	0,2654	0,1382	0,2654	0,2458	0,0327	0,0645	0,0020	0,0002	0,0063	0,0055	0,0097	0,0078	0,0095	0,0028	0,0004	0,0004

Superfície Indivíduos	Neisseriaceae não classificadas		Weissellaceae não classificadas		Eikenella não classificadas		Veillonellaceae não classificadas		Lautropia não classificadas		Leptotrichia não classificadas		Neisseria não classificadas		Kingella não classificadas	
	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada	Vetlox®	Maquinada
1	0,0030	0,0031	0,0073	0,0032	0,0006	0,0022	0,0000	0,0007	0,0027	0,0000	0,0000	0,0014	0,0006	0,0019	0,0000	0,0000
2	0,0000	0,0000	0,0005	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0008	0,0000	0,0000
3	0,0043	0,0067	0,0022	0,0022	0,0012	0,0079	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0009	0,0011	0,0014	0,0015	0,0005	0,0001
4	0,0037	0,0099	0,0024	0,0046	0,0037	0,0022	0,0000	0,0000	0,0070	0,0010	0,0018	0,0006	0,0031	0,0021	0,0001	0,0000
6	0,0027	0,0003	0,0017	0,0011	0,0027	0,0003	0,0000	0,0000	0,0010	0,0006	0,0000	0,0000	0,0050	0,0006	0,0006	0,0000
7	0,0000	0,0022	0,0024	0,0052	0,0014	0,0012	0,0007	0,0001	0,0088	0,0022	0,0007	0,0000	0,0022	0,0009	0,0002	0,0001
10	0,0003	0,0000	0,0008	0,0000	0,0002	0,0000	0,0002	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0002	0,0035
11	0,0009	0,0019	0,0009	0,0000	0,0011	0,0009	0,0000	0,0000	0,0011	0,0019	0,0000	0,0009	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
12	0,0013	0,0003	0,0013	0,0012	0,0017	0,0017	0,0269	0,0017	0,0007	0,0003	0,0033	0,0000	0,0010	0,0006	0,0000	0,0017
13	0,0000	0,0002	0,0008	0,0012	0,0003	0,0042	0,0002	0,0020	0,0000	0,0008	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
16	0,0013	0,0021	0,0011	0,0023	0,0007	0,0005	0,0007	0,0039	0,0002	0,0007	0,0004	0,0002	0,0020	0,0007	0,0004	0,0002
17	0,0033	0,0021	0,0004	0,0010	0,0000	0,0008	0,0048	0,0094	0,0000	0,0000	0,0009	0,0003	0,0015	0,0006	0,0000	0,0000
18	0,0046	0,0045	0,0001	0,0021	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,0001	0,0011	0,0015
19	0,0000	0,0011	0,0000	0,0023	0,0006	0,0011	0,0006	0,0020	0,0020	0,0025	0,0011	0,0014	0,0008	0,0009	0,0000	0,0002
20	0,0042	0,0006	0,0012	0,0006	0,0030	0,0000	0,0002	0,0000	0,0007	0,0014	0,0124	0,0000	0,0010	0,0003	0,0007	0,0000
21	0,0017	0,0018	0,0041	0,0011	0,0002	0,0006	0,0000	0,0002	0,0000	0,0004	0,0013	0,0002	0,0015	0,0016	0,0002	0,0001

<i>Capnocytophaga ochracea</i>		<i>Veillonella parvula</i>		Abiotrophia não classificadas		Bacteroides não classificadas		Brucellaceae não classificadas		<i>Capnocytophaga</i> não classificadas	
Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada	Velox®	Maquinada
0,0076	0,0078	0,0012	0,0003	0,0009	0,0000	0,0006	0,0000	0,0006	0,0009	0,0009	0,0012
0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0024	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000
0,0002	0,0007	0,0003	0,0003	0,0000	0,0001	0,0007	0,0001	0,0007	0,0000	0,0014	0,0003
0,0009	0,0011	0,0000	0,0003	0,0021	0,0006	0,0006	0,0002	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000
0,0001	0,0006	0,0006	0,0000	0,0007	0,0023	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0018	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
0,0008	0,0009	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0018	0,0000	0,0044	0,0007	0,0009
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0009	0,0000	0,0009	0,0011	0,0046	0,0000	0,0000
0,0003	0,0000	0,0143	0,0006	0,0003	0,0006	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0010
0,0000	0,0002	0,0007	0,0003	0,0011	0,0003	0,0002	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0002
0,0028	0,0014	0,0007	0,0003	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0002
0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000
0,0003	0,0020	0,0000	0,0000	0,0025	0,0005	0,0006	0,0000	0,0011	0,0011	0,0003	0,0009
0,0012	0,0000	0,0012	0,0009	0,0002	0,0000	0,0002	0,0002	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000
0,0002	0,0000	0,0006	0,0005	0,0002	0,0006	0,0002	0,0004	0,0000	0,0005	0,0000	0,0002

ANEXO III



Consentimento Informado

Código | IMP;EM;PE.17_02

Participante (Original)

Monte de Caparica, dia 10 de Abril de 2019

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito de um trabalho de investigação sob orientação do Mestre António de Sousa e do Professor Doutor Nuno Taveira, solicita-se autorização para a participação no "Estudo piloto: Caracterização in vivo do microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio" com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento sobre as superfícies dos implantes e como estas podem ou não influenciar as peri-implantites (infecção/inflamação em redor do implante que pode levar à perda do mesmo).

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios tais como responder às necessidades de cada paciente ao melhor compreender a superfície dos implantes e sua influência na forma como as bactérias se "agarram" nas mesmas. O contributo quer positivo, quer negativo das superfícies implantares ao surgimento/agravamento das peri-implantites é algo a que a investigação em causa procura dar resposta contribuindo ao progresso do conhecimento.

Este estudo não apresenta riscos para os participantes. Sendo um procedimento não invasivo e inócuo.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Nome do aluno investigador: Miguel Filipe Moura Bernardo (Aluno do 5ºAno do MIMD do IUEM)

ANEXO IV



Participante (Original)

Explicação do Estudo

"Estudo Piloto: Comportamento do filme bacteriano em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes, avaliação in vivo"

Com este trabalho pretende-se estudar as propriedades das superfícies dos implantes com diferentes tratamentos de superfície, ou seja, como é que a diferentes rugosidades, componentes que estão à superfície dos implantes influenciam a maneira como as bactérias se vão agarrar.

Para tal, iremos fazer uma observação, seguindo-se de uma avaliação do suporte periodontal (diagnóstico periodontal), assim como umas impressões (moldes) da sua boca para obtermos uns modelos em gesso e sobre estes fazemos um dispositivo intraoral (tipo goteira) no qual serão colocadas as amostras de implantes em estudo. Após isso, temos de colocá-lo na boca onde deverá permanecer durante 48 horas e durante este tempo, deverá levar uma vida normal, tirando os dispositivos apenas para comer e para lavar os dentes colocando-o nas caixas fornecidas.

Ao fim das 48 horas, o dispositivo será removido e submetido a posterior investigação laboratorial com vários microscópios.

O procedimento não apresenta riscos para os participantes. É não invasivo e inócuo.

Os resultados deste estudo permitirão aprofundar o conhecimento sobre os materiais em estudo do ponto de vista mecânico, bioquímico e biológico. De forma a perceber o que acontece em pessoas com implantes que apresentem problemas com os mesmos.

Durante toda a realização deste estudo serão respeitadas as regras de conduta expressas na Declaração de Helsínquia de 2013, Convenção de Oviedo e Legislação Nacional em vigor. Assim, fica garantida a confidencialidade sobre todas as informações pessoais recolhidas.

_____ de _____ de _____

Declaro que recebi, li e compreendi a explicação do estudo.

(Assinatura do(a) participante no estudo)

ANEXO VI

Comissão de Ética EGAS MONIZ



Proc. Interno nº 747

Ex.mo Senhor
Miguel Filipe Moura Bernardo

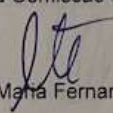
Monte de Caparica, 15 de abril de 2019.

Ex.mo Senhor,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "**Estudo piloto: Caracterização in vivo do microbioma formado em superfícies mistas e totalmente maquinadas de implantes de titânio**", foi aprovado.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Prof.ª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

ANEXO VII

