

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO PILOTO SOBRE O MICROBIOMA E RESISTOMA DA PERI-IMPLANTITE ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM METAGENÓMICA

Trabalho submetido por
Carolina dos Santos Pires
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO PILOTO SOBRE O MICROBIOMA E RESISTOMA DA PERI-IMPLANTITE ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM METAGENÓMICA

Trabalho submetido por
Carolina dos Santos Pires
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Lucinda Janete da Silva Bessa

e coorientado por
Prof. Doutor Ricardo de Almeida Castro Alves

outubro de 2023

"Cada pessoa que entra na nossa vida é como uma pincelada no quadro da nossa jornada, adicionando cores e profundidade à nossa história."

Vincent van Gogh

A todos aqueles que me acompanharam ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Professora Lucinda Bessa, agradeço a sua inabalável dedicação, por me ter revelado o verdadeiro significado de excelência, pelo apoio constante em todas as fases deste trabalho. Agradeço o facto de ter partilhado comigo novos conhecimentos, por estar sempre disponível para todas as minhas dúvidas e questões. Será um grande exemplo a ser seguido na minha próxima jornada.

Ao Professor Ricardo Alves, obrigada por me guiar e acompanhar ao longo do desenvolvimento deste trabalho, e por ser uma grande referência na periodontologia.

Aos meus pais, que proporcionaram a possibilidade de estar onde estou hoje e de alcançar tudo o que alcancei. Obrigada por todo o apoio, pelo carinho, por serem sinónimo de porto de abrigo. Este percurso e todo o trabalho também é por vocês.

A toda a minha família. Aos meus avós. Ao meu padrinho. Por, mesmo estando longe, sempre me darem apoio e transmitirem conforto. Por terem cumprido tão bem a função de me colocar um sorriso no rosto e me aquecerem o coração.

À Catarina Telo e Carolina Monteiro obrigada por me terem permitido partilhar com vocês um pouco do meu percurso e por me terem dado a possibilidade de vos integrar. Ao Sampaio e Joaquina, obrigada por serem o claro exemplo de uma amizade sincera e verdadeira. À Pipa e Nuno, obrigada por ouvirem os meus desabafos, me reconfortarem, recordarem-me sempre que o importante é darmos o nosso melhor e por acreditarem nas minhas capacidades quando eu mais duvidei delas. O que é experienciado e vivido na Egas Moniz só faz sentido para aqueles que nela passam e sinto-me grata por saber que posso sempre voltar e terei uns braços abertos para me receber.

Aos “Muchachos Locos”, obrigada por me terem apoiado desde o primeiro dia deste longo percurso e por o terem feito a meu lado. Muita da minha felicidade nesta segunda casa deve-se a vocês.

À Salomé, Maria, Duarte e Mendes, apesar de um pouco mais distantes, obrigada por me apoiarem em todos os passos que fui dando, pelas palavras de conforto e pela amizade sincera.

Por fim, gostaria de agradecer às instituições que permitiram a elaboração desta tese de mestrado, nomeadamente a empresa certificada Genoinseq, Cantanhede Technology Park Core, situada em Portugal, que permitiu a realização da análise metagenómica de shotgun e à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento.

RESUMO

Objetivo: Com a crescente colocação de implantes dentários, as doenças peri-implantares, das quais se destaca a peri-implantite (PI), são uma complicação cada vez mais prevalente. Os objetivos deste trabalho experimental foram sobretudo metodológicos 1) seleção e recrutamento de pacientes, 2) recolha de amostras de saliva e de biofilme subgengival, 3) extração do DNA microbiano, 4) envio das amostras para sequenciação metagenómica de shotgun, 5) análise da composição taxonómica e identificação de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) de algumas amostras sequenciadas. A concretização deste plano abrirá caminho para um conhecimento mais aprofundado dos perfis taxonómicos, funcionais e da prevalência de ARGs das comunidades microbianas presentes em tecidos peri-implantares saudáveis e com PI.

Metodologia: Foram recrutados pacientes com implantes saudáveis (Grupo HI) e pacientes com coocorrência de implantes com peri-implantite e saudáveis (Grupo PI) na Clínica Dentária Egas Moniz, tendo em conta determinados critérios, após aprovação pela Comissão de Ética Egas Moniz. Amostras de saliva não estimulada, de biofilme subgengival (com recurso a *periopapers*) foram recolhidas, e usadas para extração do DNA microbiano total. Estas amostras foram submetidas a sequenciação metagenómica de shotgun, realizada através de tecnologias *Illumina*.

Resultados: Dos 55 pacientes recrutados, 10 foram usados nos ensaios preliminares e 38 pacientes (20 pertencentes ao grupo HI e 18 pertencentes ao grupo PI) proporcionaram a obtenção de amostras de DNA microbiano para prosseguir para a sequenciação metagenómica. Ambos os grupos de estudo revelaram homogeneidade quanto às características demográficas e clínicas. O estudo da composição taxonómica (filo, género e espécie) e a deteção de ARGs foram feitos apenas nas amostras de dois pacientes (10 e 21).

Conclusão: Os objetivos propostos foram atingidos, uma vez que se cumpriu o plano experimental antecipado. A análise metagenómica de amostras de apenas dois pacientes é limitada e impede o alcançar de conclusões significativas e abrangentes.

Palavras-chave: Implante saudável, peri-implantite, microbioma, resistoma

ABSTRACT

Aim: With the increase in the placement of dental implants, peri-implant diseases, of which peri-implantitis (PI) stands out, are an increasingly prevalent complication. The objectives of this experimental work were essentially methodological: 1) selection and recruitment of patients, 2) collection of saliva and subgingival biofilm samples, 3) extraction of microbial DNA, 4) sending the samples for shotgun metagenomic sequencing, 5) analysis of the taxonomic composition and identification of antibiotic resistance genes (ARGs) of some sequenced samples. The achievement of this plan will pave the way for in-depth knowledge of the taxonomic and functional profiles and the prevalence of ARGs of the microbial communities present in healthy and PI peri-implant tissues.

Methodology: Patients with healthy implants (Group HI) and patients with co-occurring PI-affected and healthy implants (Group PI) were recruited from the Egas Moniz Dental Clinic, considering certain criteria, and after approval by the Egas Moniz Ethics Committee. Samples of unstimulated saliva and subgingival biofilm (using periopapers) were collected and used to extract total microbial DNA. These samples were subjected to shotgun metagenomic sequencing, using Illumina technologies.

Results: Of the 55 recruited patients, 10 were used in the preliminary assays and 38 patients (20 belonging to the HI group and 18 belonging to the PI group) provided microbial DNA samples to proceed to metagenomic sequencing. Both study groups showed homogeneity in terms of demographic and clinical characteristics. The study of the taxonomic composition (phylum, genus and species) and the detection of ARGs were only carried out on the samples of two patients (10 and 21).

Conclusion: The proposed objectives were achieved since the anticipated experimental plan was fulfilled. The metagenomic analysis of samples from only two patients is limited and prevents significant and comprehensive conclusions from being reached.

Keywords: Healthy implant, peri-implantitis, microbiome, resistome

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Implantes dentários.....	13
1.2	Adesão microbiana e formação de biofilme na superfície do implante	14
1.3	Implantes dentários – diferenças relativamente aos dentes naturais	17
1.3.1	Implante saudável.....	19
1.3.2	Implante com PI	20
1.3.2.1	Diagnóstico de PI	21
1.3.2.2	Fatores de risco e indicadores para as doenças peri-implantares	22
1.3.2.3	Tratamento da PI	23
1.3.2.3.1	Tratamento não cirúrgico	24
1.3.2.3.1.1	Descontaminação mecânica da superfície do implante	24
1.3.2.3.1.2	Tratamento com laser.....	25
1.3.2.3.1.3	Tratamento através da terapia combinada.....	25
1.3.2.3.2	Tratamento cirúrgico.....	26
1.4	Microbioma oral e resistoma oral.....	27
1.4.1	Microbioma oral	28
1.4.2	Resistoma oral	29
1.5	Estudo do microbioma e resistoma através da metagenómica	30
1.6	Objetivos principais do trabalho.....	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1	Aspetos gerais – financiamento.....	35
2.2	Estudo clínico	35
2.2.1	Seleção da amostra	35
2.2.2	Exame clínico	36
2.2.3	Análise estatística	37
2.3	Recrutamento dos pacientes e colheita da amostra	37
2.3.1	Recolha de amostras de saliva e biofilme subgengival	37
2.3.2	Otimização da recolha das amostras de biofilme subgengival.....	39
2.4	Extração de DNA genómico total das amostras	40
2.4.1	Pré-tratamento das amostras de saliva.....	40
2.4.2	Pré-tratamento das amostras de biofilme subgengival	41
2.4.3	Extração de DNA.....	41
2.4.4	Quantificação da concentração das amostras	42

2.5	Sequenciação genómica shotgun.....	43
2.6	Análise bioinformática	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Método selecionado para recolha das amostras de biofilme subgengival	47
3.2	Características demográficas e clínicas da amostra populacional	47
3.3	Composição taxonómica das amostras de dois pacientes.....	50
3.3.1	Abundância relativa do microbioma de cada amostra do paciente 10	52
3.3.2	Abundância relativa do microbioma de cada amostra do paciente 21	56
3.4	Comparação das comunidades bacterianas das amostras dos dois pacientes.	62
3.5	Genes de resistência aos antibióticos	63
3.6	Limitações do estudo	68
4	CONCLUSÃO.....	71
5	BIBLIOGRAFIA	73
6	ANEXOS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das etapas para a formação de biofilme oral no caso de implantes dentários (Adaptado de Costa et al., 2021).	15
Figura 2 – Representação da diferença entre os nichos submucosos do implante dentário e dos dentes naturais.	18
Figura 3 – Representação do arranjo das fibras do tecido conjuntivo ao redor dos implantes dentários (Adaptado de Vela & Rodríguez, 2019).	18
Figura 4 – Representação do estado de saúde do implante e de doença peri-implantar (Adaptado de Kormas et al., 2020).	19
Figura 5 – Representação esquemática da técnica cirúrgica de descontaminação com retalho aberto (Adaptado de Kormas et al., 2020).	26
Figura 6 – Representação esquemática da técnica de reposicionamento apical do retalho (Adaptado de Kormas et al., 2020).	27
Figura 7 – Esquema representativo dos principais objetivos em que se baseia este trabalho experimental.	34
Figura 8 – Material utilizado para a colheita de saliva.	38
Figura 9 – Tubo com o tampão salino estéril.	39
Figura 10 – Métodos para recolha das amostras de biofilme subgengival.	39
Figura 11 – Kit DNeasy PowerSoil Pro.	40
Figura 12 – Representação da sequência laboratorial para a preparação das amostras de saliva.	41
Figura 13 – Representação da sequência laboratorial utilizando o <i>kit DNeasy PowerSoil Pro</i> (Qiagen).	42
Figura 14 – NanoVue™ Plus e o respetivo ecrã onde são possíveis avaliar os parâmetros da concentração, rácio $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$	43
Figura 15 – Representação esquemática da preparação da biblioteca e sequenciação..	44
Figura 16 – Representação esquemática do fluxo de trabalho e ferramentas bioinformáticas usadas para obtenção dos resultados de cada amostra.	45
Figura 17 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do filo das amostras (10is e 10sa) do paciente 10.	52
Figura 18 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do género das amostras (10is e 10sa) do paciente 10.	53

Figura 19 – Abundância relativa da composição microbiana a nível da espécie relativamente ao paciente 10. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 0,5 de abundância relativa.	55
Figura 20 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do filo das amostras (21is, 21pi e 21sa) do paciente 21.	56
Figura 21 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do género das amostras (21is, 21pi, 21sa) do paciente 21. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 0,1 de abundância relativa.	58
Figura 22 – Abundância relativa da composição microbiana a nível da espécie das amostras (21is, 21pi e 21sa) do paciente 21. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 1 de abundância relativa.	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Definições de saúde e doença peri-implantar de acordo com o workshop mundial de 2017 da classificação de doenças e condições peri-implantares e periodontais (Adaptado de Berglundh et al., 2018).....	22
Tabela 2 – Características demográficas e clínicas do grupo HI e PI.....	48
Tabela 3 – Características clínicas dos pacientes 10 e 21.....	51
Tabela 4 – Processamento das sequências obtidas por análise metagenômica de shotgun: eliminação das reads de baixa qualidade e das reads do DNA humano e obtenção de MAGs após montagem e binning.	51
Tabela 5 – Principais tipos de ARGs encontrados nas amostras dos dois pacientes.	64
Tabela 6 – Características dos ARGs encontrados nas amostras analisadas.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP – Academia Americana de Periodontologia

ANI – *Average nucleotide identity*

ARGs – Genes de resistência aos antibióticos

CARD – *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CDEM – Clínica Dentária Egas Moniz

CiiEM – Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz

EFP – Federação Europeia de Periodontologia

FCPI – Fluido crevicular peri-implantar

FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia

GGB – *Genus-level genome bins*

PBS – Tampão fosfato salino

PI – Peri-implantite

PMA – Monoazida de propídio

PS – Profundidade de sondagem

MAGs – Genomas montados em metagenoma

RVG – Radiovisiografia

SGBs – *Species-level genome bins*

1 INTRODUÇÃO

Desde os anos 70 até aos dias de hoje, a colocação de implantes dentários para a substituição de dentes ausentes contribui para a redução do número de pacientes edêntulos a nível mundial e para melhorar a qualidade de vida destes permitindo restabelecer a função mastigatória, fonética e estética (Dabdoub et al., 2013; Komatsu et al., 2020; Kormas et al., 2020). O tratamento com implantes dentários é cada vez mais previsível e acessível devido às constantes inovações técnicas (Assunção et al., 2023; Ghensi et al., 2020; Wang et al., 2017). Estima-se que atualmente o aumento anual de colocação de implantes ronde os 14% a nível mundial, mas prevê-se que alcançará os 23% no ano de 2026 (Kormas et al., 2020). Estima-se ainda que os implantes dentários tenham uma taxa média de sobrevivência de 95% (Moraschini et al., 2015).

Não obstante, com o aumento da colocação de implantes dentários, as doenças peri-implantares tornaram-se mais prevalentes, daí a necessidade de as caracterizar, compreender a sua natureza e patogénese, de forma a se conseguir implementar o tratamento mais adequado (Ghensi et al., 2020; Kormas et al., 2020; Kubasiewicz-Ross et al., 2020; Schwarz et al., 2021). Sobretudo porque estas doenças podem variar desde uma leve inflamação dos tecidos moles até uma considerável perda óssea progressiva que pode por em causa a sobrevivência dos implantes dentários (Wang et al., 2017).

1.1 Implantes dentários

Os implantes dentários são dispositivos metálicos implantados no osso, substituindo a porção da raiz de um dente em falta, sendo adaptado a este um pilar transmucoso que permite fazer a sua conexão com a restauração protética final, permitindo melhorar a qualidade de vida, estética e autoestima do paciente (Belibasakis, 2014; Belibasakis et al., 2015; Paraizo et al., 2020; Wang et al., 2017). Porém, os implantes dentários podem apresentar falhas na sua função. Estas dividem-se em 1) falhas precoces – devido à osteointegração incompleta do implante dentário antes ou depois da colocação da carga funcional e 2) falhas tardias – devido à interrupção da função de um implante dentário já osteointegrado pela existência de patologia nos tecidos peri-implantares (Belibasakis, 2014). Dentro das falhas precoces podemos destacar como causas a contaminação durante a cirurgia, baixa compatibilidade do material do implante

dentário e uma cicatrização ineficaz (Belibasakis, 2014). Para além disso, também se pode classificar as falhas em mecânicas ou biológicas, sendo que a PI se enquadra nesta última.

Comparando os dentes naturais com os implantes dentários, os primeiros apresentam uma união ao epitélio através dos hemidesmossomas e das fibras de colagénio que após a sua extração são perdidos, enquanto nos implantes dentários, os tecidos cicatriciais acabam por diminuir as capacidades de defesa dos tecidos moles (Becker et al., 2014).

1.2 Adesão microbiana e formação de biofilme na superfície do implante

A cavidade oral constitui um ambiente único e dinâmico para a formação de biofilme pois abriga diversos habitats que incorporam diversas comunidades microbianas, todas elas banhadas em saliva (Barroso et al., 2018; Belibasakis et al., 2015; Song et al., 2015). Estas comunidades microbianas desenvolvem-se em paralelo com o seu hospedeiro, logo a sua sobrevivência depende da capacidade destas em aproveitar os nutrientes disponíveis no meio, bem como a sua capacidade para escapar ao sistema imunitário do hospedeiro (Belibasakis et al., 2015; Song et al., 2015).

Em termos clínicos, nos implantes a colonização microbiana inicia-se a nível supragengival, sendo que a formação inicial e a composição do biofilme dependem de fatores como as propriedades da superfície e topografia do implante, condições do meio oral como o pH, a presença de carboidratos fermentáveis e uma má higiene oral (Apaza-Bedoya et al., 2017). A renovação rápida do epitélio de revestimento da cavidade oral é um mecanismo que permite reduzir a adesão microbiana (Barroso et al., 2018; Song et al., 2015). Os implantes, sendo superfícies duras e abióticos que não descamam, são mais propícios à formação de biofilme e à acumulação de placa bacteriana (Belibasakis et al., 2015; Frédéric et al., 2018).

Quando o implante se encontra exposto na cavidade oral, ocorre o processo de adesão e formação do biofilme passando por várias fases: 1) após colocação do implante na cavidade oral este é revestido por proteínas da saliva (segmento supramucoso) e do plasma (segmento submucoso) iniciando assim a infiltração de proteínas como resposta biológica do hospedeiro seguido pela adesão microbiana; 2) processos de coagregação que permitem a formação do biofilme; 3) fase de maturação e, por fim 4) a fase da dispersão (Arciola et al., 2018; Souza et al., 2021).

Numa fase inicial ocorre adsorção de proteínas dando origem a uma camada de proteínas na superfície do implante que, por sua vez, formam interações com as bactérias originando a fixação das bactérias pioneiras (maioritariamente bactérias Gram-positivas) a estas proteínas através de mecanismos físico-químicos não específicos. A superfície do implante é, de seguida, coberta por uma camada denominada de película adquirida composta maioritariamente por proteínas, glicoproteínas e lípidos, que promove a colonização bacteriana inicial através de mecanismos de coagregação e interações entre as diversas espécies presentes, fornecendo recetores de superfície (adesinas) para a ligação específica de determinadas espécies bacterianas (maioritariamente bactérias Gram-negativas, bastonetes, organismos filamentosos e espiroquetas) ocorrendo então a adesão bacteriana (Belibasakis, 2014; Bowen et al., 2018). Estas comunicam através do *quorum sensing* em que determinadas moléculas de sinalização são produzidas e conseguem ser detetadas pelas bactérias vizinhas de forma a se agregarem, o que leva à acumulação organizada das espécies microbianas e à formação do biofilme (Figura 1) (Belibasakis et al., 2015; Bessa et al., 2022; Bowen et al., 2018; Frédéric et al., 2018; Polizzi et al., 2022). O *quorum sensing* corresponde a uma comunicação química geneticamente controlada e que se produz pelo aumento da densidade celular que irá influenciar a tolerância, a virulência e a formação do biofilme oral (Preethanath et al., 2017).

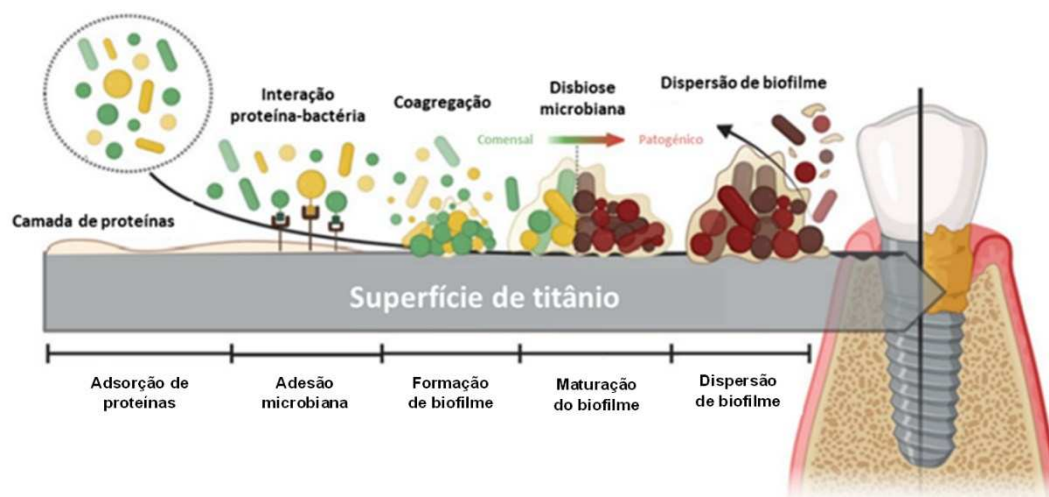


Figura 1 – Representação das etapas para a formação de biofilme oral no caso de implantes dentários (Adaptado de Costa et al., 2021).

Em seguida, forma-se o biofilme maduro, que pode desagregar-se do implante levando à dispersão bacteriana e a colonização noutros locais, bem como a sua difusão

para a corrente sanguínea podendo originar infecções sistêmicas (Arciola et al., 2018; Belibasakis et al., 2015).

A composição e abundância do biofilme oral, pode em certas circunstâncias induzir alterações inflamatórias nos tecidos que os rodeiam, levando ao aparecimento de certas doenças como a PI, que por sua vez pode culminar na remoção do implante (explantação) (Busscher et al., 2010; Song et al., 2015). No entanto, o microbioma do biofilme peri-implantar provém de vários nichos existentes na cavidade oral como os dentes vizinhos, os tecidos mucosos e a saliva presente (Belibasakis et al., 2015).

A adesão e formação de biofilme na superfície do implante, é influenciada por várias características, como a molhabilidade, as cargas eletroquímicas da superfície e a topografia/textura da mesma, assim como o tipo de material (Busscher et al., 2010; Kotsakis & Olmedo, 2021; Song et al., 2015). A molhabilidade é importante na determinação das forças de ligação entre as bactérias e a superfície, sendo que um aumento da rugosidade da superfície aumenta a área de contacto entre a superfície do material e as células microbianas, promovendo a sua adesão principalmente em locais onde a remoção mecânica convencional não é eficiente, portanto suavizar a superfície pode reduzir a formação de biofilme (Belibasakis, 2014; Busscher et al., 2010; Kubasiewicz-Ross et al., 2020; Song et al., 2015).

A superfície de titânio do implante quando exposta a um meio fluído ou ao ar, forma uma camada passiva de óxido de titânio fina, amorfa e pouco cristalina, que origina uma interface entre o meio biológico e a estrutura metálica ficando assim resistente à corrosão (Alves et al., 2022; Apaza-Bedoya et al., 2017; Belibasakis et al., 2015; Kotsakis & Olmedo, 2021).

Para além do titânio também existem implantes dentários em ligas de ouro e zircónia. Nos implantes fabricados em ligas de ouro, ocorre uma menor acumulação de placa bacteriana por esta ser muito estável e apresentar uma energia de superfície baixa, contudo apresenta uma menor biocompatibilidade com os tecidos moles quando comparadas com o titânio e zircónia (Sampatanukul et al., 2018; Yamane et al., 2013). Os implantes de zircónia e ouro apresentam melhores resultados estéticos em relação aos implantes de titânio, maioritariamente quando se trata de pacientes com um biótipo gengival fino ou uma linha de sorriso alta (De Avila et al., 2014; Sampatanukul et al., 2018). Os implantes de zircónia também apresentam uma menor acumulação de placa

bacteriana devido a apresentarem uma baixa condutividade elétrica, no entanto apresentam algumas falhas técnicas como a fratura do material (Alves et al., 2022; De Avila et al., 2014; Sampatanukul et al., 2018).

Por fim, o titânio dentro de todos os materiais existentes no mercado continua a ser o material de eleição para a elaboração dos implantes dentários, devido a propriedades como a sua biocompatibilidade, resistência à corrosão quando está em contacto com os fluídos orais e a resistência mecânica que apresentam aquando da mastigação (Alves et al., 2022; Apaza-Bedoya et al., 2017).

1.3 Implantes dentários – diferenças relativamente aos dentes naturais

As complicações biológicas que afetam os implantes dentários têm um cariz inflamatório tanto dos tecidos moles como do osso em redor destes e, estão associadas a uma disbiose (desequilíbrio na composição da microbiota, com diminuição da diversidade) da comunidade microbiana do hospedeiro (Renvert et al., 2018; Schwarz et al., 2021). Um dos fatores chave para que haja sucesso dos implantes dentários a longo prazo é a manutenção dos tecidos ao redor destes saudáveis. Para isso é importante educar para um regime preventivo eficaz e caso ocorra alguma patologia nos tecidos circundantes a intervenção terapêutica deve ser o mais precoce possível (Dreyer et al., 2018; Renvert et al., 2019; Renvert & Quirynen, 2015). Os critérios de sucesso após colocação do implante incluem a ausência de mobilidade, de dor e perda óssea peri-implantar superior a 1,5mm no primeiro ano, por outro lado, os critérios de sucesso relativos ao tecido mole que circunda os implantes dentários incluem a ausência de supuração e hemorragia e, por fim os critérios de sucesso relativos ao paciente são o agrado com a estética e a capacidade de conseguir devolver a função mastigatória sem qualquer desconforto (Kormas et al., 2020).

Os nichos submucosos que rodeiam os implantes dentários são diferentes daqueles que rodeiam os dentes naturais (Figura 2), sendo que nos primeiros há 1) ausência do ligamento periodontal (Figura 2b), 2) presença de uma interface direta entre titânio e osso, 3) arranjo do tecido conjuntivo ao redor do implante e 4) um fluxo sanguíneo deficiente (Belibasakis, 2014; Yu et al., 2019). O fluido crevicular peri-implantar (FCPI), corresponde ao exsudado existente no sulco ou bolsa peri-implantar existente entre a superfície do implante e a mucosa peri-implantar, sendo que pode progredir de sulco para

bolsa à medida que a doença peri-implantar se desenvolve devido ao biofilme presente neste local (Belibasakis et al., 2015). Este apresenta na sua composição uma grande variedade de biomarcadores de diagnóstico, células do hospedeiro e microrganismos que permitem avaliar as possíveis interações fisiológicas que ocorrem entre o hospedeiro e a microflora oral (Chaparro et al., 2022).

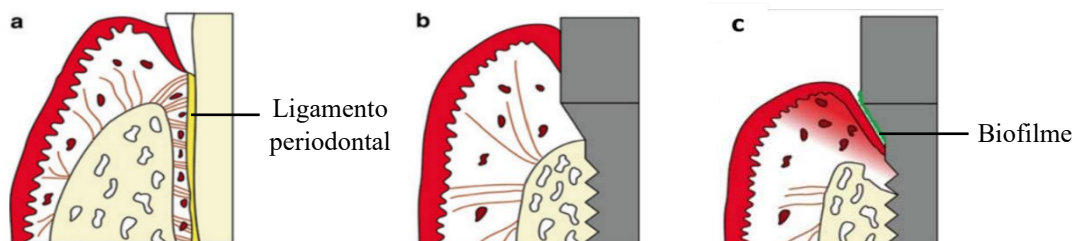


Figura 2 – Representação da diferença entre os nichos submucosos do implante dentário e dos dentes naturais: (a) Tecidos periodontais com ligamento periodontal; (b) Tecidos peri-implantares sem ligamento periodontal; (c) Inflamação da mucosa peri-implantar devido à acumulação de biofilme (Adaptado de Belibasakis et al., 2015).

Tendo em conta o arranjo do tecido conjuntivo mucoso nos implantes dentários, nota-se que estes não apresentam as fibras de colagénio inseridas perpendicularmente, mas sim inseridas paralelamente à superfície do implante (Figura 3) formando um espécie de colar à volta deste (Belibasakis, 2014; Kormas et al., 2020; Sampatanukul et al., 2018). Esta configuração resulta num sulco peri-implantar mais profundo quando comparado com o sulco gengival, permitindo uma penetração mais profunda dos microrganismos (Belibasakis, 2014; Belibasakis et al., 2015). Para além disto, a ausência de ligamento periodontal, faz com que haja um menor suprimento sanguíneo e, consequentemente a migração das células do sistema imunitário responsáveis por combater os primeiros estadios das doenças está diminuída (Belibasakis et al., 2015).

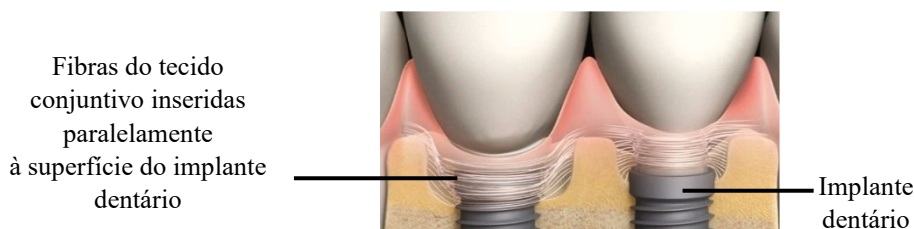


Figura 3 – Representação do arranjo das fibras do tecido conjuntivo ao redor dos implantes dentários (Adaptado de Vela & Rodríguez, 2019).

Do ponto de vista microbiológico, sabe-se que o microbioma dos tecidos que circundam um implante dentário (comunidades peri-implantares) difere daquele que

circunda o periodonto de um dente natural (comunidades subgengivais), uma vez que as superfícies onde se forma o biofilme são distintas (Dabdoub et al., 2013; Heuer et al., 2012; Kotsakis & Olmedo, 2021; Kumar et al., 2012). Similarmente, também no estado de doença, os microbiomas são distintos; a superfície de um implante com PI é colonizada por agentes patogênicos diferentes das bactérias periodontopatogênicas, como por exemplo *Staphylococcus spp.* e *Candida spp.* (Kormas et al., 2020).

Para se avaliar a presença ou ausência de inflamação no implante, recorre-se a diversos métodos e instrumentos tais como, a inspeção visual intraoral, a realização de sondagem com auxílio de uma sonda periodontal e a palpação digital (Berglundh et al., 2018). Durante o exame oral é importante realizar a sondagem dos tecidos peri-implantares para assim avaliar a presença de hemorragia à sondagem, monitorizar caso haja aumento da profundidade de sondagem (PS) e, perante isso há que se ponderar a necessidade de intervenção terapêutica (Berglundh et al., 2018). Contudo, é de lembrar que pode existir saúde do tecido peri-implantar em redor do implante, mesmo este apresentando um suporte ósseo reduzido (Berglundh et al., 2018).

1.3.1 Implante saudável

Para avaliarmos o estado de um implante dentário, é necessária uma inspeção visual. É considerado saudável quando existe ausência de sinais clínicos de inflamação dos tecidos moles que o circundam (Figura 4a), isto é, ausência de eritema (tecidos rosa em vez de vermelho), ausência de edema (tecido firme e não com consistência mole), ausência de hemorragia/supuração após sondagem, ausência de aumento da PS em comparação com diagnósticos anteriores e, uma inspeção radiográfica em que se deve verificar ausência de perda óssea radiográfica (Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2018; Yu et al., 2019).

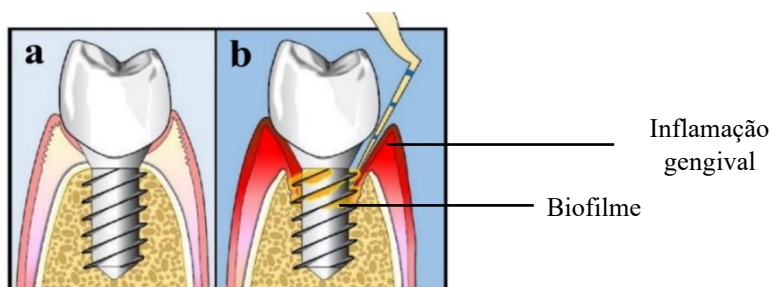


Figura 4 – Representação do estado de saúde do implante e de doença peri-implantar: (a) Implante saudável; (b) Implante com PI (Adaptado de Kormas et al., 2020).

Histologicamente, a mucosa em redor de um implante saudável apresenta 3 a 4 mm de altura, é constituída por epitélio queratinizado (mucosa mastigatória) e epitélio não queratinizado (mucosa de revestimento), sendo que a porção que está voltada para o implante tem uma porção mais coronal revestida por epitélio sulcular e um epitélio de união fino, enquanto que o segmento mais apical apresenta tecido conjuntivo em contacto direto com o implante dentário que contém um pequeno infiltrado de células inflamatórias (Araujo & Lindhe, 2018; Berglundh et al., 2018).

Aquando da realização da sondagem periodontal de um implante dentário, pode existir um ponto de sangramento local, que pode ser justificado pelo facto do tecido mole em redor dos implantes apresentar menos resistência à sondagem quando comparado com a gengiva saudável em locais adjacentes aos dentes, logo em termos de relevância clínica este ponto sangrante não pode ser considerado um sinal de inflamação, mas sim sangramento realizado por trauma (Renvert et al., 2018). Este trauma pode ser provocado pela aplicação de uma força excessiva quando se realiza a sondagem periodontal ou devido a dificuldades no posicionamento correto da sonda periodontal no sulco/bolsa (Renvert et al., 2018, 2019). De forma a evitar a existência destes pontos sangrantes que podem tornar o diagnóstico dúbio, a sondagem de implantes deve ser realizada com forças leves, cerca de 0,25 Newton (Renvert et al., 2018).

1.3.2 Implante com PI

A PI corresponde a uma condição patológica da cavidade oral que afeta tanto os tecidos moles quanto os tecidos duros que circundam os implantes dentários; é mediada por biofilmes polimicrobianos e está associada a indicadores e fatores de risco específicos, que serão descritos e aprofundados mais à frente (Ghensi et al., 2020; Paraizo et al., 2020; Schwarz et al., 2021; Wang et al., 2017). Pode ser influenciada pela resposta imunitária específica do hospedeiro, pela sua genética, pelo seu estilo de vida, por fatores ambientais e por fatores do próprio implante como as características da sua superfície e o seu design (Ghensi et al., 2020; Kotsakis & Olmedo, 2021).

A PI resulta de um processo contínuo de inflamação dos tecidos que desencadeia uma alteração na homeostase do hospedeiro no sulco peri-implantar e, pode levar a que ocorra perda de osso peri-implantar de suporte, que excede a perda devido à remodelação fisiológica normal (Ganesan et al., 2022; Ghensi et al., 2020; Kormas et al., 2020; Wang

et al., 2017; Yu et al., 2019). A PI pode afetar de forma independente diferentes implantes dentários na mesma cavidade oral (Berglundh et al., 2018; Ghensi et al., 2020; Kotsakis & Olmedo, 2021).

É importante ter em atenção que cada paciente apresenta características únicas na resposta inflamatória às comunidades microbianas que residem nos implantes dentários e na taxa de progressão de perda óssea (Berglundh et al., 2018). Não obstante, podem existir situações em que ocorre perda óssea peri-implantar devido a fatores iatrogénicos, como o mau posicionamento do implante, por trauma cirúrgico ou devido ao encaixe incorreto da coroa sobre o implante dentário (Berglundh et al., 2018; Schwarz et al., 2021).

1.3.2.1 Diagnóstico de PI

O diagnóstico de PI vai depender se existem registos anteriores do estado do implante e, tal como no diagnóstico de um implante saudável, também é necessário realizar uma inspeção visual para avaliar os sinais clínicos. Esses sinais clínicos incluem a presença de edema, hemorragia após a realização da sondagem, presença de supuração, dor, aumento da PS e uma inspeção radiográfica em que se verifica um aumento da perda óssea radiográfica em comparação a diagnósticos anteriores (Ghensi et al., 2020; Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2019; W. C. Wang et al., 2017; Yu et al., 2019). Caso não existam registos anteriores, definimos PI como a presença de hemorragia e/ou supuração à sondagem, PS igual ou superior a 6 mm bem como perda óssea radiográfica igual ou superior a 3 mm para apical desde a parte mais coronal da porção intraóssea do implante (Berglundh et al., 2018; Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2019). Por fim, em estádios mais avançados da doença, pode existir mobilidade do implante (Belibasakis, 2014).

Histologicamente, as lesões de PI difundem-se apicalmente ao epitélio de união e existe o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e linfócitos em grande número e densidade, estando então muitas vezes associadas à inflamação aguda e a uma intensa sinalização pro-inflamatória (Berglundh et al., 2018; Kotsakis & Olmedo, 2021). Tendo em conta o seu padrão de progressão, a PI na ausência de tratamento pode apresentar uma progressão não linear e acelerada (Berglundh et al., 2018; Renvert et al., 2018).

Na Tabela 1 são apresentadas as diferenças entre implante saudável e implante com PI, e caso haja ou não registros anteriores.

Tabela 1 – Definições de saúde e doença peri-implantar de acordo com o workshop mundial de 2017 da classificação de doenças e condições peri-implantares e periodontais (Adaptado de Berglundh et al., 2018).

	Implante saudável	Implante com PI (com registros anteriores)	Implante com PI (sem registros anteriores)
Sinais de inflamação	Ausente	Presente	Presente
Hemorragia à sondagem com ou sem supuração	Ausente	Presente	Presente
Aumento da PS em relação à última consulta	Ausente	Presente	≥ 6mm
Aumento da perda óssea radiográfica	Ausente	Presente (não deve ser ≥ 2mm)	≥ 3mm

1.3.2.2 Fatores de risco e indicadores para as doenças peri-implantares

Existe uma diferença entre um fator de risco e um indicador, o primeiro corresponde a agentes causais que provocam ou aumentam a probabilidade de desenvolver a doença e dependem de estudos longitudinais enquanto que um indicador infere-se a partir de dados transversais (Kormas et al., 2020). Relativamente aos fatores de risco para as doenças peri-implantares, podemos destacar o tabagismo, diabetes mellitus (não controlada), história anterior de PI, adesão dos pacientes à terapêutica, falta de manutenção adequada após a colocação do implante e a suscetibilidade genética (Belibasakis, 2014; Dreyer et al., 2018; Kormas et al., 2020; Mameno et al., 2019; Renvert & Quirynen, 2015; Wang et al., 2017).

Um dos componentes do tabaco, a nicotina tem características de vasoconstrição portanto vai reduzir o fluxo sanguíneo, diminuindo a quantidade de nutrientes nos locais de cicatrização e o tabaco também possui alguns compostos que atuam como substâncias quimiotáticas que devido às enzimas libertadas pelos macrófagos provocam destruição tecidual (Nguyen-Hieu et al., 2012).

A diabetes mellitus (não controlada) é uma condição sistêmica inflamatória na qual a resposta imunitária se encontra alterada, afetando os eventos catabólicos e anabólicos da cicatrização óssea ocorrendo o aumento da osteoclastogênese e o comprometimento da atividade osteoblástica (De Oliveira et al., 2020). Tendo em consideração diversas meta-análises os pacientes diabéticos apresentam uma probabilidade 50% superior de desenvolver PI comparando com pacientes não diabéticos (Dreyer et al., 2018; Monje et al., 2017; Wang et al., 2017).

A adesão dos pacientes à profilaxia e acompanhamento regular, é bastante importante na monitorização da saúde dos implantes, sem isso o risco de desenvolver PI é maior (Kormas et al., 2020; Sarmiento et al., 2018).

Dentro dos indicadores de risco encontram-se o controlo de placa bacteriana, perfil de emergência da coroa do implante superior a 30° (posicionamento do implante que não facilita a sua higienização e manutenção), excesso de cimento submucoso devido à colonização de microrganismos nos restos de cimento e localização do implante (Berglundh et al., 2018; Renvert et al., 2019; Renvert & Quirynen, 2015; Schwarz et al., 2021; Staubli et al., 2017).

1.3.2.3 Tratamento da PI

No que respeita ao tratamento da PI, existem diversas abordagens que podemos realizar e que serão mencionadas. Dentro destas, podemos destacar abordagens cirúrgicas e não cirúrgicas, sendo que esta última deve sempre preceder a abordagem cirúrgica para que se consiga fazer uma melhoria da higiene oral e uma redução da inflamação presente nos tecidos peri-implantares (Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2019; Wang et al., 2019).

Existem alguns fatores chave aos quais se deve dar ênfase aquando da escolha e realização do tratamento, tais como a história clínica do paciente, a configuração do defeito, a estética, a possibilidade e a capacidade do paciente conseguir ter um bom acesso para conseguir fazer o controlo da placa bacteriana após o tratamento (Renvert et al., 2019; Wang et al., 2017). O objetivo principal do tratamento é resolver o processo inflamatório com a preservação tanto dos tecidos duros como moles, de forma a reduzir a PS e o sangramento durante a sondagem (Heitz-Mayfield & Mombelli, 2014; Kubasiewicz-Ross et al., 2020; Renvert et al., 2019).

1.3.2.3.1 Tratamento não cirúrgico

1.3.2.3.1.1 Descontaminação mecânica da superfície do implante

Esta técnica tem como objetivo fazer a remoção do biofilme aderido à superfície do implante e, reduzir a comunidade microbiana de forma a chegar a um estado de saúde peri-implantar (Kormas et al., 2020; Nguyen-Hieu et al., 2012; Sirinirund et al., 2019; Wang et al., 2019). Neste caso, realiza-se o desbridamento mecânico com o auxílio de curetas, dispositivos ultrassônicos ou com dispositivos abrasivos a ar (Kormas et al., 2020; Louropoulou et al., 2012). Em relação às curetas elas podem ser fabricadas de vários materiais (Sirinirund et al., 2019). As curetas de aço, como a sua dureza é superior à do titânio podem provocar estragos na superfície dos implantes, e estão contraindicadas. As curetas de titânio, por outro lado, como têm a mesma dureza que a superfície do implante (caso sejam fabricados em titânio) devem ser utilizadas para fazer o desbridamento. Por fim as curetas de plástico também podem ser utilizadas para este fim, contudo são mais frágeis e aquando do desbridamento pode ocorrer a deposição de partículas de plástico na superfície do implante (Yang et al., 2015). De notar que determinadas características das curetas não metálicas como a sua flexibilidade e o tamanho, podem dificultar a sua colocação no local correto, o que irá originar uma remoção incompleta do biofilme (Louropoulou et al., 2012).

Os dispositivos ultrassônicos apresentam uma eficácia semelhante aos instrumentos manuais (curetas) utilizados para realizar o desbridamento (Sirinirund et al., 2019). Apesar de ser possível utilizar as pontas ultrassônicas normais, também existem pontas específicas que sejam compatíveis com os materiais dos implantes dentários como pontas em fibra de carbono, silicone ou plástico (Figuero et al., 2014; Wang et al., 2019).

Por fim, os dispositivos abrasivos a ar, devem ser utilizados de forma cautelosa pois podem provocar danos nos tecidos moles e, em casos mais graves causar enfisemas tecidulares, no entanto, conseguem preservar a integridade da superfície do implante (Kormas et al., 2020; Sirinirund et al., 2019).

1.3.2.3.1.2 Tratamento com laser

A terapia de desbridamento mecânico sem mais nenhuma intervenção terapêutica mostrou não ser eficaz para o tratamento da PI, como tal, foi proposta a utilização de laser como adjuvante (Kormas et al., 2020). Esta associação apresentou uma capacidade mais elevada no tratamento da PI quando comparada com a realização apenas do desbridamento mecânico (Khoury et al., 2019; Kormas et al., 2020). Contudo, os lasers que possuem alta potência podem provocar um aumento de temperatura indesejado, e têm também a desvantagem de serem mais dispendiosos, mas por outro lado não provocam alterações significativas na superfície do implante (Kubasiewicz-Ross et al., 2020; Wang et al., 2019). Em relação a esta técnica, a principal dificuldade é o facto de ser realizada às cegas e tendo em conta a sensação tátil do médico dentista (Wang et al., 2019). Os seus efeitos para além do que já foi referido, vão igualmente depender da quantidade de energia transmitida pelo laser e da capacidade do tecido absorver, refletir e transmitir a energia (Garaicoa-Pazmino et al., 2019).

1.3.2.3.1.3 Tratamento através da terapia combinada

A terapia com antimicrobianos, serve como complemento à terapia mecânica, cujo objetivo é realizar um desbridamento eficaz da superfície do implante de forma a manter a sua integridade aliado a agentes antimicrobianos como os antissépticos e antibióticos (Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2019). Entre os antibióticos, conclui-se que o uso de antibióticos sistémicos aliado ao desbridamento mecânico pode provocar uma superinfecção por microrganismos oportunistas, aumentando assim a resistência aos antibióticos (Verdugo et al., 2016). Em contrapartida, a utilização de antibióticos locais demonstrou algumas melhorias clínicas e microbiológicas (Kormas et al., 2020).

A realização da descontaminação mecânica aliada a terapias adjuvantes, tais como o uso de antibióticos tópicos ou sistémicos, não parece trazer benefícios pois apenas permite que ocorram melhorias mínimas na diminuição do sangramento, na redução das bolsas existentes e, além disso, existe falta de consenso e evidências da sua eficácia (Bessa et al., 2022; Khoury et al., 2019; Renvert et al., 2019).

1.3.2.3.2 Tratamento cirúrgico

Apesar do tratamento não cirúrgico da PI ser mais conservador, existe uma elevada taxa de recidiva, por isso a terapia cirúrgica é muitas vezes indicada, principalmente em casos cuja infecção já envolve as estruturas ósseas (Bessa et al., 2022; Kormas et al., 2020; Wang et al., 2017). Os objetivos do tratamento cirúrgico prendem-se com a descontaminação da superfície do implante, estabelecer uma anatomia positiva tanto dos tecidos duros como moles em redor do implante de forma a favorecer a limpeza da sua superfície e, se possível a regeneração do defeito ósseo (Carcuac et al., 2015; Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2019; Sarmiento et al., 2018).

Dentro das várias opções cirúrgicas podemos destacar o desbridamento com retalho aberto, o retalho de reposicionamento apical e a regeneração óssea guiada (Kormas et al., 2020). Na descontaminação com retalho aberto (Figura 5), o que se faz é abrir um retalho de forma a ter acesso direto à superfície do implante, para posteriormente se realizar a descontaminação através da técnica mecânica, seguida do reposicionamento da mucosa ao nível da margem original do retalho realizado. Esta opção terapêutica, como temos visão direta, é mais eficaz quando comparada ao desbridamento mecânico sem a realização de retalho e, permite que se consiga estabelecer um ambiente saudável e limpo para que ocorra a cicatrização dos tecidos (Renvert et al., 2019). Aliado a esta técnica pode ser realizada uma ligeira implantoplastia, ou seja, suavizar as espiras do implante com pontas diamantadas e instrumentos de polimento com irrigação, de forma a que a adesão de biofilme seja mais difícil (Belibasakis et al., 2015; Khoury et al., 2019). A implantoplastia, normalmente é realizada com brocas diamantadas de 15 e 40 μm , sendo a pedra de Arkansas e as brocas de borracha em forma de chama utilizadas para o polimento (Garaicoa-Pazmino et al., 2019).

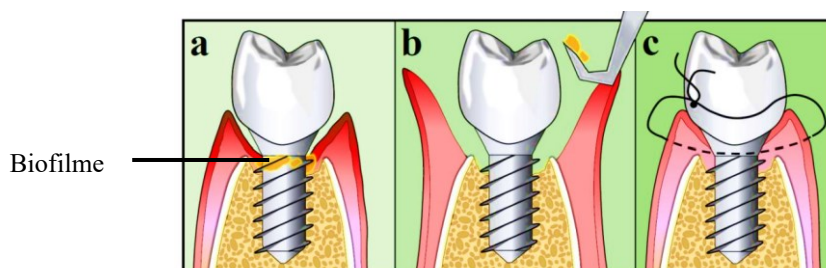


Figura 5 – Representação esquemática da técnica cirúrgica de descontaminação com retalho aberto: (a) Aparência do implante com PI antes do tratamento cirúrgico; (b) Abertura do retalho e descontaminação mecânica; (c) Resultado após a cirurgia (Adaptado de Kormas et al., 2020).

A técnica de reposicionamento apical do retalho (Figura 6), é realizada quando os implantes apresentam uma perda óssea horizontal sem que haja defeitos infraósseos e, pode ser aliada a implantoplastia (Figura 6b) com o objetivo de tornar a superfície dos implantes que ficam expostas após o posicionamento do retalho, mais lisas de forma a facilitar a higienização (Kormas et al., 2020; Sarmiento et al., 2018; Wang et al., 2017).

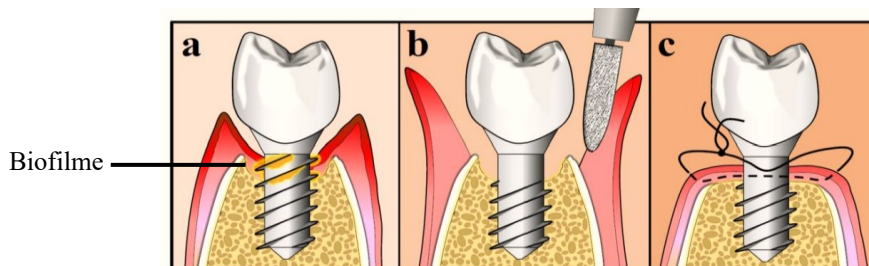


Figura 6 – Representação esquemática da técnica de reposicionamento apical do retalho: (a) Aparência do implante com PI antes do tratamento cirúrgico; (b) Abertura do retalho e ligeira implantoplastia; (c) Resultado após a cirurgia (Adaptado de Kormas et al., 2020).

A decisão de optar por um tratamento através de uma terapia ressetiva ou regenerativa, vai depender do defeito ósseo, ou seja, vai depender do número de paredes ósseas restantes (Nguyen-Hieu et al., 2012; Wang et al., 2017). Caso se opte pela terapia regenerativa pode ser realizada a aplicação de substitutos ósseos com ou sem membrana para os reter, que irão permitir a regeneração de tecido duro (Khoury et al., 2019). Por outro lado, o objetivo da terapia ressetiva é diminuir a profundidade dos defeitos infraósseos com o posicionamento apical dos retalhos de forma a que se consiga ter um melhor acesso para se realizar uma higiene oral adequada (Belibasakis et al., 2015; Khoury et al., 2019; Sarmiento et al., 2018).

1.4 Microbioma oral e resistoma oral

O microbioma humano pode dividir-se em: 1) microbioma central, compartilhado por todos os indivíduos e é composto pelas espécies predominantes encontradas em várias regiões do corpo em condições saudáveis, ou seja, corresponde a um microbioma constante associado a um determinado hospedeiro ou a um ambiente específico e, 2) em microbioma variável, como o próprio nome sugere, é singular e específico para cada indivíduo, uma vez que depende de pressões seletivas como o estilo de vida,

características fisiológicas, disponibilidade de nutrientes e exposição aos antibióticos (Almeida et al., 2020; Berg et al., 2020; Deo & Deshmukh, 2019; Lamont et al., 2018).

Dentro do microbioma humano podemos destacar o microbioma oral que, apresenta um papel fundamental no estado de saúde (tem um papel protetor contra os microrganismos patogênicos exógenos e oportunistas) ou doença da cavidade oral. Portanto, aprofundar o conhecimento do microbioma oral e concretamente de nichos específicos, tal como o da saliva ou do biofilme subgengival, assim como dos respetivos resistomas, no estado de saúde e de doença, será essencial para desenvolver ou melhorar as estratégias de diagnóstico e o respetivo tratamento (Bessa et al., 2022; Deo & Deshmukh, 2019; Frédéric et al., 2018; Kormas et al., 2020). Para além disso, a cavidade oral e a sua imensidão de microrganismos, encontram-se distribuídos na mesma de acordo com as suas propriedades metabólicas e bioquímicas, estão envolvidos em diversas doenças sistémicas como a diabetes mellitus, doença cardiovascular, entre outras (Alves et al., 2022; Rosenbaum et al., 2019). Por todas essas razões, é essencial aprofundar o estudo do microbioma oral, da sua composição, função, estrutura e dinâmica.

Em particular, a caracterização do microbioma em pacientes com implantes saudáveis e em pacientes que apresentam PI é o passo fulcral para melhor se conseguir adequar o tratamento e minimizar o impacto do mesmo, sobretudo o tratamento antibiótico (seleção do antibiótico, aplicação tópica ou sistémica, uso de antisséptico em vez de antibiótico) e, para que se tente evitar ao máximo que os pacientes percam o implante (Alves et al., 2022; Ghensi et al., 2020).

1.4.1 Microbioma oral

O microbioma oral pode ser definido como um ecossistema dinâmico que inclui vírus, a microbiota oral (como bactérias, fungos, archaea e protozoários), e os seus elementos estruturais e metabolitos, assim como moléculas produzidas pelo hospedeiro partilhado (Bessa et al., 2022).

Os microrganismos presentes no microbioma oral atuam como comunidades simbiotes e dinâmicas em relação ao hospedeiro, podendo existir diversas mudanças que alteram o seu equilíbrio como, alterações fisiológicas (idade) e alterações hormonais (como a puberdade e a gravidez no caso de indivíduos do sexo feminino) (Frédéric et al., 2018; Kilian et al., 2016). Tendo em conta o género, foi demonstrado que as hormonas

sexuais femininas podem de certa forma afetar os perfis microbianos, para além disso, verificou-se que o microbioma oral de mulheres grávidas quando comparado com mulheres não grávidas apresenta uma contagem mais elevada de microrganismos e, que a presença de determinadas bactérias orais aumenta o risco de ocorrência e efeitos adversos na gravidez (Kumar, 2013; Saadaoui et al., 2021). Como demonstrado anteriormente, ser fumador é um fator de risco para o desenvolvimento de PI, e precisamente para averiguar como é que o fumo influencia o microbioma oral, Tsigarida e colaboradores mostraram que o microbioma peri-implantar de indivíduos fumadores apresentava uma diversidade menor de microrganismos quando comparado com o microbioma de não fumadores pois nos primeiros existia um enriquecimento de microrganismos patogénicos e uma diminuição dos microrganismos comensais (Tsigarida et al., 2015).

Como todos os microbiomas, o microbioma oral também está em constante evolução devido às interações entre as espécies microbianas e entre estas e o hospedeiro (Bessa et al., 2022). Quando o microbioma oral é alterado, é instalada a disbiose, ou seja, deixa de estar em homeostase (simbiose) e as bactérias que originam doenças, as bactérias patogénicas, assumem o controlo originando um estado de doença (disbiose) da cavidade oral (Kilian et al., 2016). Assim, podemos afirmar que o microbioma oral tem um papel fundamental na manutenção da homeostase oral pois protege a cavidade oral e previne o desenvolvimento de doenças, logo é imprescindível que este se mantenha equilibrado (Bessa et al., 2022; Deo & Deshmukh, 2019; Tramice et al., 2022).

1.4.2 Resistoma oral

O resistoma oral inclui todos os ARGs existentes no microbioma oral (Sukumar et al., 2016). Corresponde a uma das maiores ameaças na saúde pública, sendo esta conferida devido à presença de ARGs, que podem ser encontrados no microbioma oral (Bessa et al., 2022; Kang et al., 2021; Sukumar et al., 2016). Na prática clínica odontológica, os agentes antimicrobianos mais prescritos são os antibióticos, visto que os médicos dentistas podem prescrevê-los com duas finalidades: 1) como terapêutica para o tratamento de infeções orais ou 2) como profilaxia para reduzir a possibilidade de possíveis complicações e sintomas associados ao tratamento realizado (Bessa et al., 2022; Buonavoglia et al., 2021). Porém, a sua prescrição baseia-se maioritariamente na

experiência e não no diagnóstico definitivo daí se prescreverem antibióticos de largo espectro (Buonavoglia et al., 2021). Existe a necessidade da criação de diretrizes para o uso correto destes fármacos que se baseiam na seleção do princípio ativo ideal, dosagem, via de administração e duração correta, bem como a realização de testes de suscetibilidade antibiótica, de forma a evitar que ocorram efeitos adversos e o desenvolvimento de resistências (Buonavoglia et al., 2021; Verdugo et al., 2016). Para além disto, a decisão de prescrever ou não um antibiótico deve ter em conta a história clínica completa do paciente nomeadamente ter uma noção de quais os antibióticos que foram utilizados no passado, o seu exame clínico e um diagnóstico rigoroso (Bessa et al., 2022; Verdugo et al., 2016).

A resistência das bactérias aos antibióticos pode ser 1) intrínseca - inerente aos traços fisiológicos pré-existentes na espécie e 2) adquirida - tanto por transferência de genes (através de mecanismos de conjugação, transformação e transdução) como por mutações de genes existentes (Sukumar et al., 2016).

Adicionalmente, até à data, o resistoma oral tem sido vagamente estudado (Kang et al., 2021). Contudo, com o avanço das técnicas de *next generation sequencing* é possível ter uma melhor compreensão e conhecimentos acerca da diversidade e quantidade de ARGs existentes no microbioma oral, o que permitirá num futuro próximo com a monitorização do resistoma oral criar um perfil de resistência completo do microbioma oral de cada indivíduo, bem como ter uma melhor compreensão acerca do resistoma oral em estado de saúde ou doença, ter níveis de referência para o uso correto dos antibióticos e, por fim desenvolver novas alternativas e estratégias para o tratamento de infeções na cavidade oral (Bessa et al., 2022; Deo & Deshmukh, 2019; Sukumar et al., 2016).

1.5 Estudo do microbioma e resistoma através da metagenómica

O termo metagenómica surgiu em 1998 para caracterizar uma análise genómica direta da comunidade microbiana de amostras ambientais contendo uma grande variedade de espécies, por técnicas independentes do isolamento e cultura (Sukumar et al., 2016). Existem essencialmente duas tipologias de sequenciação metagenómica, a sequenciação metagenómica de amplificação 16S ou 18S, que permite a sequenciação de genes alvo específicos como o 16S rRNA (presente nas bactérias), ou o 18S rRNA (presente nos

fungos), e a sequenciação metagenômica de shotgun (DNA metagenômico total). Os avanços da bioinformática, permitiram desenvolver ferramentas cruciais para analisar e integrar os dados obtidos através da sequenciação metagenômica de shotgun.

Relativamente à análise metagenômica, qualquer que seja a tipologia, inicialmente é necessário fazer a recolha das amostras de acordo com o propósito do estudo e, seguidamente realizar a extração do DNA microbiano total (Huang et al., 2021). Após esta extração, as amostras de DNA passam por um controlo de qualidade (Huang et al., 2021).

Comparando a análise metagenômica de shotgun com a sequenciação do gene 16S rRNA, a segunda técnica é menos dispendiosa, mas é limitada apenas à deteção (presença e abundância de organismos procarióticos, não conseguindo traçar um perfil global da comunidade microbiana) (Deo & Deshmukh, 2019; Ghensi et al., 2020). Este gene (16S rRNA) é um marcador taxonómico e filogenético que permite fazer a identificação de determinadas comunidades bacterianas, contudo requer que haja a sua amplificação através da técnica de PCR e só depois é que é possível fazer a sua sequenciação (Al-Hebshi et al., 2019; Deo & Deshmukh, 2019). Por outro lado, a análise metagenômica de shotgun envolve a extração, processamento e sequenciação shotgun (não direcionado) do DNA e, através deste consegue fornecer a análise taxonómica, mas também os perfis funcionais e biológicos para as diversas comunidades microbianas, como por exemplo determinar e quantificar quais os ARGs presentes, fazer uma previsão da expressão dos genes e avaliar as interações dos organismos de toda a comunidade microbiana (Al-Hebshi et al., 2019; Deo & Deshmukh, 2019; Quince et al., 2017; Sukumar et al., 2016).

A análise por sequenciação metagenômica de shotgun, usada para determinar a composição taxonómica e os perfis funcionais das comunidades microbianas, incluindo bactérias, archaea, vírus, fungos e protozoários, raramente tem sido aplicada para estudar o microbioma na PI (Deo & Deshmukh, 2019). A maioria dos estudos realizados com o objetivo de estudar o seu microbioma na PI, têm na verdade explorado apenas o bacterioma, através da sequenciação do gene 16S rRNA (Komatsu et al., 2020; Yu et al., 2019). Através da sequenciação metagenômica de shotgun do biofilme subgengival de implantes saudáveis ou com PI, será possível desvendar o microbioma disbiótico da PI (Ghensi et al., 2020; Yu et al., 2019).

Vários estudos realizados até à atualidade permitiram desmitificar a ideia de que o microbioma existente na periodontite é semelhante ao existente na PI. Para tal, através da sequenciação do gene 16S rRNA e da sequenciação metagenómica de shotgun conseguiu mostrar-se que a composição microbiana dos biofilmes presentes na PI apresenta uma diferença significativa em termos qualitativos e quantitativos quando comparada com a composição dos biofilmes da periodontite, para além disso, também se conseguiu demonstrar que o microbioma das comunidades microbianas em estado de doença (PI) é diferente das em estado de saúde apresentando uma maior diversidade microbiana (Dabdoub et al., 2013; Komatsu et al., 2020; Sanz-Martin et al., 2017; Verdugo et al., 2016; Yu et al., 2019). No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para se conseguir determinar ao pormenor o microbioma disbiótico existente na PI.

1.6 Objetivos principais do trabalho

Os objetivos principais deste trabalho prendem-se com a execução de um plano que inclui uma série de etapas sequenciais, fundamentais para se alcançarem resultados que serão analisados e correlacionados futuramente no âmbito do projeto de investigação em que este trabalho de tese se insere.

O plano de trabalhos do projeto está ilustrado na Figura 7. E este trabalho experimental sobrepõe-se em grande parte a esse plano, uma vez que teve como objetivos principais:

1) Selecionar e recrutar pacientes na Clínica Dentária Egas Moniz (CDEM). Esses pacientes apresentavam implantes saudáveis (Grupo HI) ou coocorrência de implantes saudáveis e implantes com PI (Grupo PI);

2) Recolher amostras de saliva e de biofilme subgengival dos mesmos pacientes que foram recrutados: a) uma amostra de saliva colhida a cada paciente de ambos os grupos; b) uma amostra de biofilme subgengival de um implante saudável de cada paciente do Grupo HI; c) duas amostras de biofilme, uma de um implante saudável e outra de um implante com PI, de cada paciente do grupo PI;

3) Extrair DNA microbiano de todas as amostras colhidas;

4) Envio dessas mesmas amostras para sequenciação metagenômica de shotgun;

5) Análise inicial da composição taxonômica e identificação de ARGs de algumas amostras sequenciadas.

A concretização destes objetivos permitirá abrir novos caminhos no sentido de se alcançar e obter mais conhecimentos relativamente aos perfis taxonômicos (abundância) e funcionais, bem como saber qual a prevalência de ARGs nas amostras analisadas. E em última instância, no final do projeto, espera-se contribuir para um melhor conhecimento do microbioma e do resistoma do biofilme subgengival de implantes quer saudáveis quer com PI. Tal conhecimento será crucial para a futura descoberta de eventuais novos biomarcadores que possam facilitar o diagnóstico, prevenção e tratamento da PI.

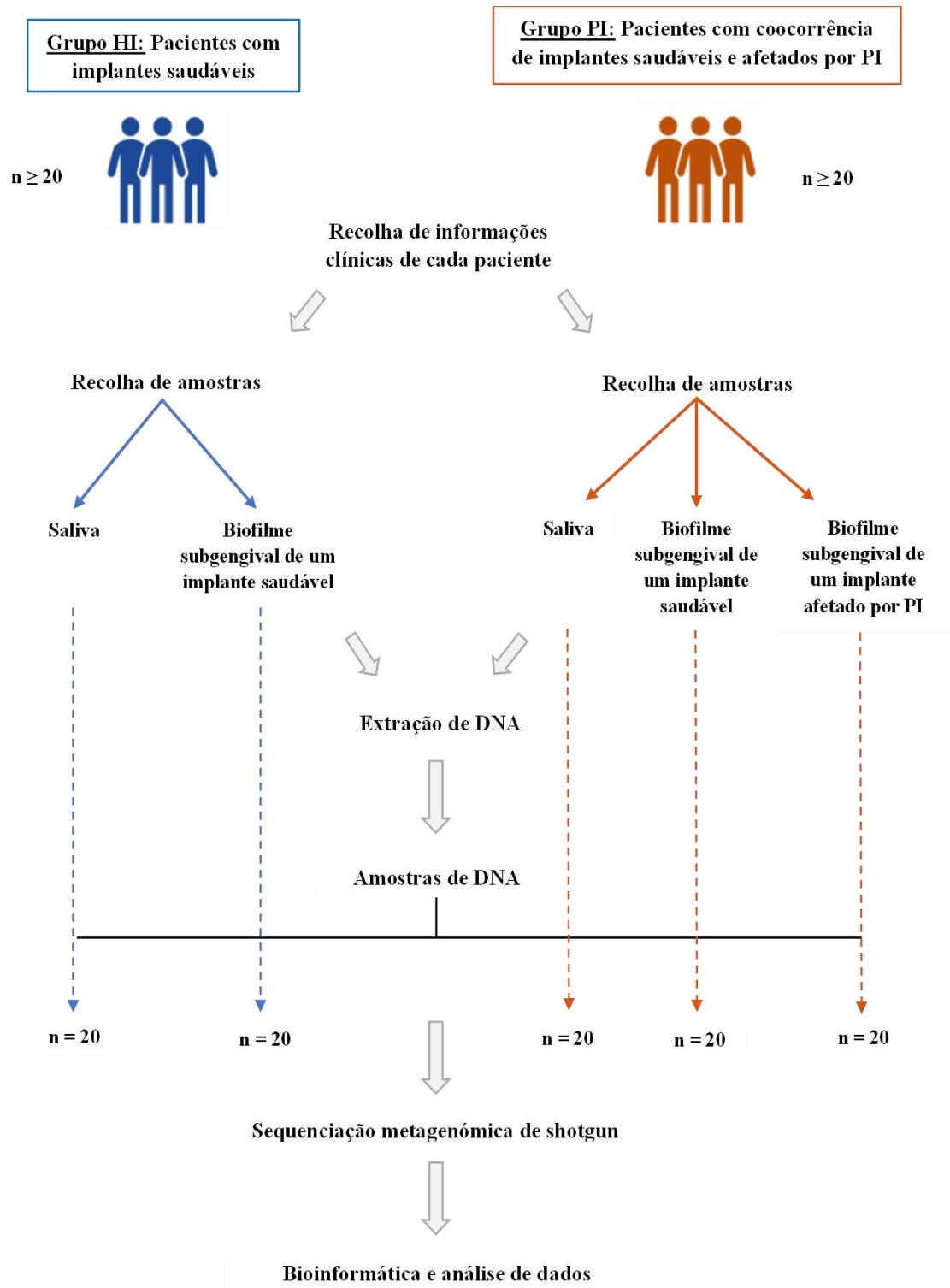


Figura 7 – Esquema representativo dos principais objetivos em que se baseia este trabalho experimental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspetos gerais – financiamento

Este trabalho de investigação está inserido no âmbito do projeto “MICROresist-PI: Metagenomic snapshot of the microbiome and resistome in peri-implantitis: pilot study” (2022.01430.PTDC) que é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), tendo como Investigador Responsável a Professora Doutora Lucinda Bessa e como Investigador Corresponsável o Professor Doutor Ricardo Alves. A execução deste trabalho envolveu e decorreu na CDEM e também no Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiiEM).

2.2 Estudo clínico

2.2.1 Seleção da amostra

Após aprovação concedida pela Comissão de Ética Egas Moniz (nº1123) (anexo 1) para o acesso aos dados, informação clínica e recolha de amostras de pacientes da CDEM, foram recrutados, desde fevereiro até início de setembro de 2023, 55 pacientes.

Foram recrutados pacientes com implantes saudáveis (Grupo HI) e pacientes com coocorrência de implantes com PI e implantes saudáveis (Grupo PI). O recrutamento destes teve em conta critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. Relativamente aos critérios de inclusão, foram incluídos pacientes 1) adultos (18 ou mais anos) que formalizaram a sua aprovação de participação no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Informado (anexo 2), 2) que tinham implantes dentários, no mínimo com o historial de pelo menos um ano em função e, 3) que aceitaram responder a um breve questionário (anexo 3) que permitiu aferir o cumprimento de alguns critérios de inclusão e averiguar a presença do critério de exclusão. O critério de exclusão considerado foi a toma de antibiótico locais e/ou sistémicos nos dois meses que antecederam a consulta de recolha de amostras.

Previamente à realização do exame clínico e da recolha das amostras, todos os pacientes selecionados para o estudo foram contactados de forma a cumprirem alguns critérios necessários tais como, não comer nem beber nas 2 h que antecedem a recolha e não lavar os dentes ou bochechar com qualquer colutório ou solução nas 24 h que

antecedem a recolha. Também foram informados e esclarecidos sobre qual o objetivo do estudo e da importância da sua participação no mesmo.

2.2.2 Exame clínico

Foram realizados diversos procedimentos e protocolos de forma a otimizar e selecionar o método mais apropriado para recolha das amostras de biofilme subgingival dos implantes (anexo 4 e 5). Para estes ensaios preliminares foram recrutados 10 pacientes. Mais 45 pacientes foram recrutados para integrarem o estudo.

No início da consulta, foi recolhida, com o auxílio de um questionário (anexo 3), informação pessoal e clínica, incluindo idade, género, gravidez e amamentação, presença de alguma patologia imune, inflamatória ou que leve à perda de peso, medicação regular, hábitos tabágicos, número de dentes remanescentes e de implantes dentários e a sua localização na cavidade oral.

De seguida, foi feito o diagnóstico para averiguar a saúde ou doença dos implantes tendo como base as definições incluídas na classificação de 2018 para doenças periodontais e peri-implantares estabelecidas pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) e pela Federação Europeia de Periodontologia (EFP) (Caton et al., 2018). O diagnóstico de implante saudável envolveu os seguintes critérios clínicos: ausência de sinais clínicos de eritema e edema, ausência de hemorragia/supuração à sondagem, ausência de aumento da PS (quando comparado com diagnósticos anteriores) e ausência de perda óssea radiográfica (Berglundh et al., 2018; Renvert et al., 2018; Yu et al., 2019). Em relação ao diagnóstico de PI: presença de hemorragia ou supuração à sondagem, aumento da PS, presença de edema e perda óssea radiográfica avaliada em radiografias periapicais (Berglundh et al., 2018; Yu et al., 2019). Para a avaliação clínica foi necessário recorrer a um *kit* básico (composto por uma pinça, sonda e espelho com o respetivo cabo) e a uma sonda periodontal graduada (CP-12), enquanto para o exame radiográfico houve recurso a um paralelizador e a um sensor intraoral de radiovisiografia (RVG) ou a uma película de fósforo de forma a obter as radiografias periapicais.

2.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados com recurso ao programa informático IBM® SPSS® Statistics v.29, sendo aplicadas metodologias de análise descritiva e inferencial. Na análise inferencial foram utilizados testes estatísticos comparativos, de acordo com a tipologia das variáveis e características dos dados. Neste contexto de análise foi estabelecido um nível de significância de 5%.

2.3 Recrutamento dos pacientes e colheita da amostra

Nos pacientes do Grupo HI, foram recolhidas uma amostra de saliva e uma amostra de biofilme subgengival de um local de implante saudável e nos pacientes do Grupo PI foram recolhidas três amostras: uma amostra de saliva, uma amostra de biofilme subgengival de um local de implante saudável e uma amostra de biofilme subgengival de um local de implante afetado por PI.

2.3.1 Recolha de amostras de saliva e biofilme subgengival

A recolha das amostras de saliva e do biofilme subgengival foram realizadas antes de qualquer bochecho com clorhexidina (como protocolizado no início de todas as consultas na CDEM), uma vez que a clorhexidina como é bactericida reduz a carga bacteriana (em diversidade e abundância) e também atua sobre fungos e vírus (quebra a membrana dos vírus com envelope o que causa o extravasamento do seu conteúdo) que estejam presentes na cavidade oral (Brookes et al., 2021). Após o registo dos dados com o auxílio do questionário e a assinatura do consentimento informado, foi feito o diagnóstico (presença de implante saudável ou presença de implante saudável + implante afetado por PI) e procedeu-se à recolha das amostras.

Relativamente à colheita de saliva, esta foi realizada por meio de um método não estimulado diretamente num tubo de colheita de saliva (ClearLine®, Biosigma, Itália) (Figura 8a) com o auxílio de um coletor de recolha de saliva (Salimetrics®, SalivaBio, USA) (Figura 8b).

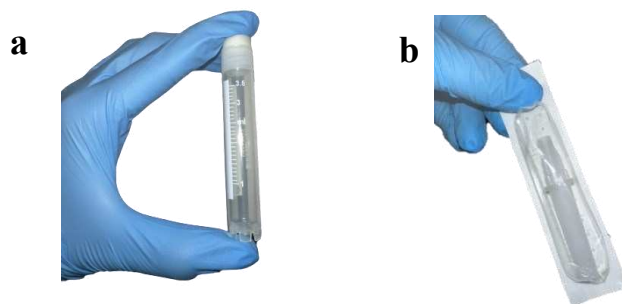


Figura 8 – Material utilizado para a colheita de saliva: (a) Tubo de colheita de saliva específico; (b) Coletor de recolha de saliva.

Para a utilização do coletor de saliva, em primeiro lugar com luvas colocadas abriu-se a manga estéril onde este estava e colocou-se no frasco de colheita específico, seguidamente pediu-se ao paciente, que se encontrava com a cabeça inclinada, para acumular saliva na boca e depois deixá-la cair para dentro do frasco sem cuspir ou forçar, de forma que não se formasse espuma ou bolhas. Obteve-se pelo menos 1 mL de saliva de cada paciente. Após a recolha, foi adicionado, em câmara de segurança biológica classe II (Nino Labinterior, ninoSAFE class II, Escandinavia), glicerol estéril às amostras na concentração de 20%. Seguidamente, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos estéreis DNase/RNase free e, imediatamente armazenadas a -80°C .

Antes da recolha de amostras de biofilme subgengival, em primeiro determinou-se qual a localização dos implantes onde se realizaria a recolha. Posteriormente, isolou-se de forma relativa o local com rolos de algodão. A área foi limpa com uma bola de algodão estéril para remover o biofilme da superfície do implante e a placa supragengival e, assim evitar a contaminação do biofilme subgengival com esta. Foram recolhidas amostras de um único implante, com o auxílio de *periopapers* estéreis livres de DNA (PerioPaper® GCF Collection Strips, Oraflow, EUA). Cada *periopaper* foi inserido com uma pinça dentária estéril no sulco ou na bolsa dos implantes de forma suave até se sentir uma ligeira resistência. Foram usados três *periopapers* por cada implante amostrado (previamente houve necessidade de otimizar esta recolha, como demonstrado na secção seguinte). Por fim, as amostras foram imediatamente colocadas em tubos estéreis DNase/RNase free de 1,5 mL (Figura 9), contendo 750 μL de tampão salino estéril (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1mM EDTA, pH 8.0; 0.5% Tween-20) e de seguida armazenados a -80°C para posterior extração de DNA.

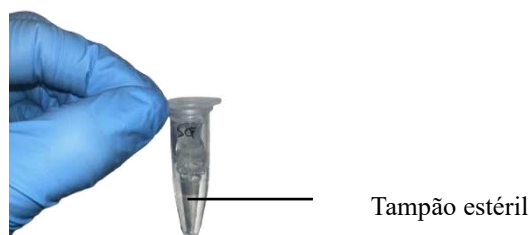
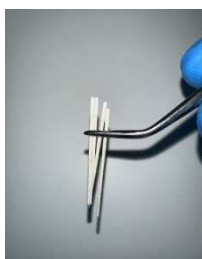


Figura 9 – Tubo com o tampão salino estéril.

2.3.2 Otimização da recolha das amostras de biofilme subgengival

Este passo fulcral foi feito de forma a otimizar o protocolo de recolha das amostras subgengivais tanto dos implantes saudáveis como dos implantes com PI para posterior extração de DNA e subsequente análise de sequências metagenómica de shotgun (como apresentado no anexo 5).

Inicialmente, foram recolhidas as amostras através de três métodos diferentes, nomeadamente: 1) Quatro cones de papel tamanho 45 (Figura 10a); 2) Uma cureta e um cone de papel tamanho 45 (Figura 10b); 3) Três *periopapers* 0-1,2 μ L (Figura 10c). O procedimento de recolha para cada um destes métodos foi diferenciado. Em relação aos cones de papel, foram inseridos através da superfície do implante e do sulco gengival com uma pinça estéril. Com a cureta, realizou-se primeiramente um desbridamento com esta entre a superfície do implante e o sulco gengival e, seguidamente foi inserido o cone de papel. Através dos *periopapers*, estes foram inseridos, cerca de 1 minuto, entre a superfície do implante e o sulco gengival com uma pinça estéril. Por fim todas as amostras foram armazenadas a -80°C .



a



b



c

Figura 10 – Métodos para recolha das amostras de biofilme subgengival: (a) Quatro cones de papel tamanho 45; (b) Cureta e um cone de papel tamanho 45; (c) Três *periopapers*.

2.4 Extração de DNA genômico total das amostras

A extração do DNA genômico total das amostras de saliva e de biofilme subgingival realizou-se usando o kit *DNeasy PowerSoil Pro* (Qiagen, Alemanha) (Figura 11). O procedimento foi realizado em câmara de segurança biológica de classe II.



Figura 11 – Kit *DNeasy PowerSoil Pro*.

2.4.1 Pré-tratamento das amostras de saliva

De seguida descrevem-se os passos do pré-tratamento das amostras de saliva que precedeu a extração de DNA com o objetivo de proporcionar a depleção do DNA humano (Marotz et al., 2021):

- Cada amostra de saliva (1 mL) foi descongelada à temperatura ambiente e posteriormente vortexada;
- Centrifugou-se a 15 000 $\times g$, à temperatura ambiente durante 6 min de forma a sedimentar as células formando um *pellet* (Figura 12a);
- Foi removido o sobrenadante cuidadosamente de forma a não deslocar o *pellet* (Figura 12b);
- Adicionaram-se 200 μL de *nuclease-free H₂O* para ressuspender o *pellet* e deixou-se à temperatura ambiente durante 6 min (este passo proporcionou a lise osmótica das células humanas, que são mais vulneráveis à pressão osmótica do que as células microbianas);
- Adicionaram-se 10 μL de 0.2 mM monoazida de propídio (PMA) de forma a obter uma concentração de 10 μM (Figura 12c) e deixou-se à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 5 min para permitir que o PMA se intercalasse no DNA livre;

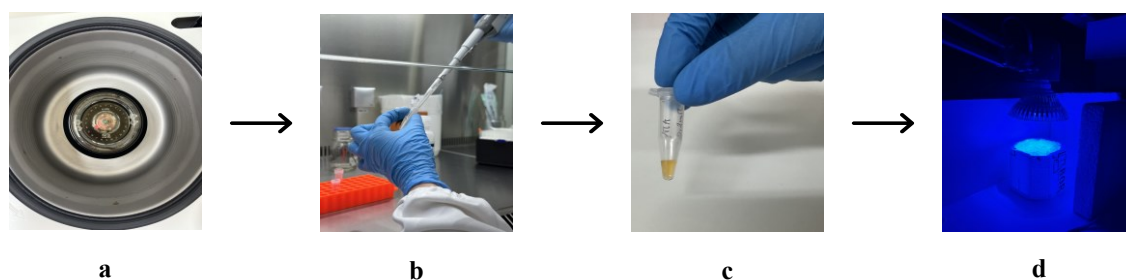


Figura 12 – Representação da sequência laboratorial para a preparação das amostras de saliva: (a) Colocação das amostras na centrífuga; (b) Remoção do sobrenadante; (c) Adição do PMA; (d) Exposição das amostras à fonte de luz azul.

- De seguida, as amostras foram colocadas horizontalmente sobre gelo, e expostas a uma fonte de luz azul com o comprimento de onda de 488 nm, a uma distância < 15 cm (Figura 12d), durante 25 min, vortexando as amostras ocasionalmente (a exposição a esta luz fez com que o PMA se ligasse covalentemente ao DNA, fragmentando-o; esses fragmentos foram posteriormente eliminados no processo de extração).

2.4.2 Pré-tratamento das amostras de biofilme subgengival

O pré-tratamento das amostras de biofilme que precedeu a extração de DNA, envolveu os seguintes passos sequenciais:

- Descongelamento das amostras;
- Centrifugação a 15.000 ×g por 6 min a 4° C;
- Remoção do sobrenadante;
- Lavagem com 750 µL de tampão fosfato salino estéril (PBS) (o que implicou centrifugar novamente e rejeitar o sobrenadante);
- Ressuspensão do *pellet* em 200 µL de *nuclease-free* H₂O;
- De seguida, o procedimento foi idêntico ao acima descrito após adição do PMA.

2.4.3 Extração de DNA

Seguidamente, procedeu-se à extração de DNA microbiano utilizando o *kit DNeasy PowerSoil Pro* (Qiagen) (Figura 11), de acordo com as indicações do fabricante (Figura 13). As amostras de saliva pré-tratadas foram transferidas para o tubo *PowerBead*

Pro e procedeu-se a partir daí como descrito. No caso das amostras de biofilme subgingival, foi necessário transferir os *periopapers*, com uma pinça estéril, para o tubo *PowerBead Pro*; a suspensão que restou foi centrifugada; rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 800 µL da solução CD1, tendo depois o procedimento sido efetuado como descrito.

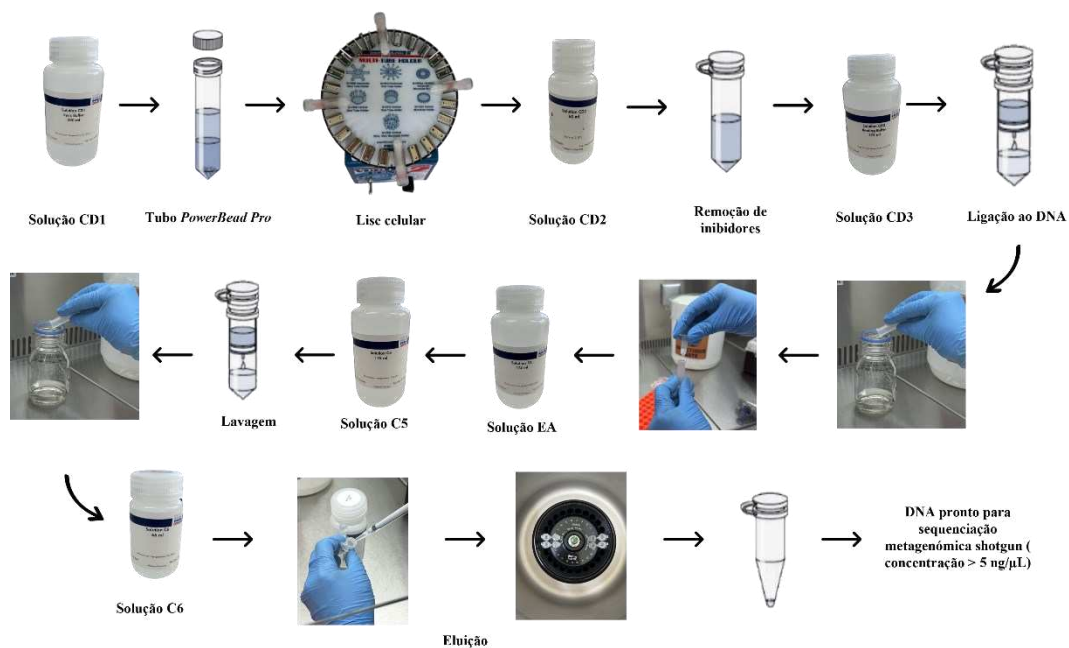


Figura 13 – Representação da sequência laboratorial utilizando o kit *DNeasy PowerSoil Pro* (Qiagen).

2.4.4 Quantificação da concentração das amostras

Por fim, terminado o processo de extração do DNA e antes de o enviar para a empresa certificada para fazer a sua análise e quantificação, foram removidos 4 µL para um novo tubo estéril DNase/RNase free para avaliação espectrofotométrica da concentração e pureza do DNA utilizando um NanoVue™ Plus (Spectrophotometer NanoVue Plus, Bluetooth GE Healthcare, Reino Unido) (Figura 14). A concentração devia de ser idealmente ≥ 5 ng/µL, o rácio de $A_{260/280}$ devia de estar entre 1.8-2.0 para DNA puro e, por último o rácio de $A_{260/230}$ deveria de ser > 1.8 (normalmente 2.0-2.2), pois caso contrário o DNA estava contaminado.

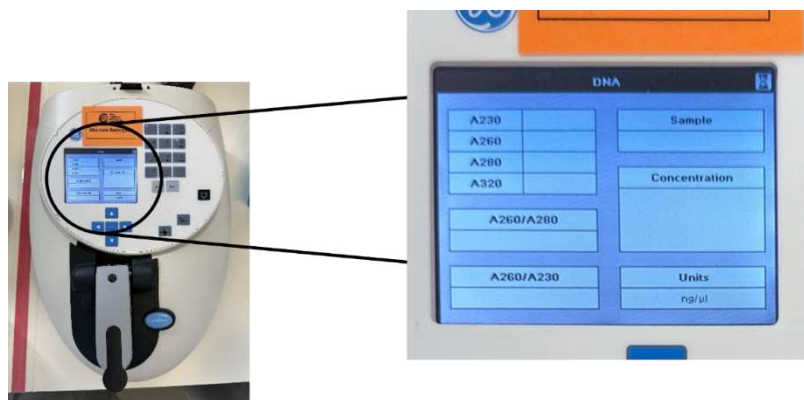


Figura 14 – NanoVueTM Plus e o respetivo ecrã onde são possíveis avaliar os parâmetros da concentração, rácio A_{260/280} e A_{260/230}.

Caso o DNA de uma das amostras do mesmo paciente não tivesse a concentração, qualidade e pureza suficientes para as análises de metagenómica posteriores, então, todas as amostras desse paciente eram descartadas e o paciente era assim eliminado do estudo, sendo um novo paciente recrutado.

2.5 Sequenciação genómica shotgun

Todas as amostras de DNA foram enviadas para uma empresa certificada (Genoinseq, Cantanhede Technology Park Core, Portugal) para a preparação de bibliotecas e sequenciação metagenómico de shotgun usando tecnologias *Illumina* para *paired reads* (Figura 15). Esta técnica complexa permitiu a sequenciação paralela do DNA de todos os organismos na comunidade, com alta cobertura para deteção ao nível das espécies. Na empresa, as amostras passaram por um controlo de qualidade adicional para verificar a degradação do DNA através de eletroforese em gel de agarose, para o quantificar através de mecanismos de fluorimetria com Qubit (> 1 ng/μL) e, para ver a presença de inibidores que podiam comprometer a preparação das bibliotecas. A preparação destas realizou-se através do *kit Nextera XT (Illumina)* que permite o uso de DNA com baixas concentrações. A sequenciação realizou-se na plataforma *NextSeq 550 Illumina*.



Figura 15 – Representação esquemática da preparação da biblioteca e sequencição.

2.6 Análise bioinformática

As *raw reads* foram correlacionadas e processadas para remover *adaptors*, e filtradas (*trimming*) *reads* de baixa qualidade, além de sequências contaminantes, especificamente, DNA do hospedeiro (Figura 16). Seguiu-se a montagem em *contigs* utilizando o MetaSpades e agrupados em *metagenome assembled genomes* (MAGs) com o MetaBat2. Depois para identificar e anotar a função dos genes foi utilizado o sistema *Prokka*.

As sequências foram comparadas aos bancos de dados filogenéticos e funcionais para obter perfis taxonômicos e funcionais e, em particular, a análise da diversidade. Foi determinada a abundância diferencial de ARGs, i) entre pacientes com PI e pacientes saudáveis, ii) dentro de um único paciente com coocorrência de PI e implante saudável, iii) entre saliva e biofilmes subgengivais dentro do mesmo paciente, saudável ou com PI. Esta análise da presença de ARGs foi realizada com a base de dados *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) que é selecionada manualmente e desenvolvida para abranger todo o espectro de ARGs. A taxonomia foi identificada através de diversas abordagens como o MetaPhlan com *reads* de alta qualidade e CheckM para análise dos MAGs. Estes foram comparados através do ANI (*Average nucleotide identity*) para se conseguir identificar um maior número de espécies.

Por fim, obteve-se um relatório bioinformático de todos os dados e metadados de cada amostra analisada.

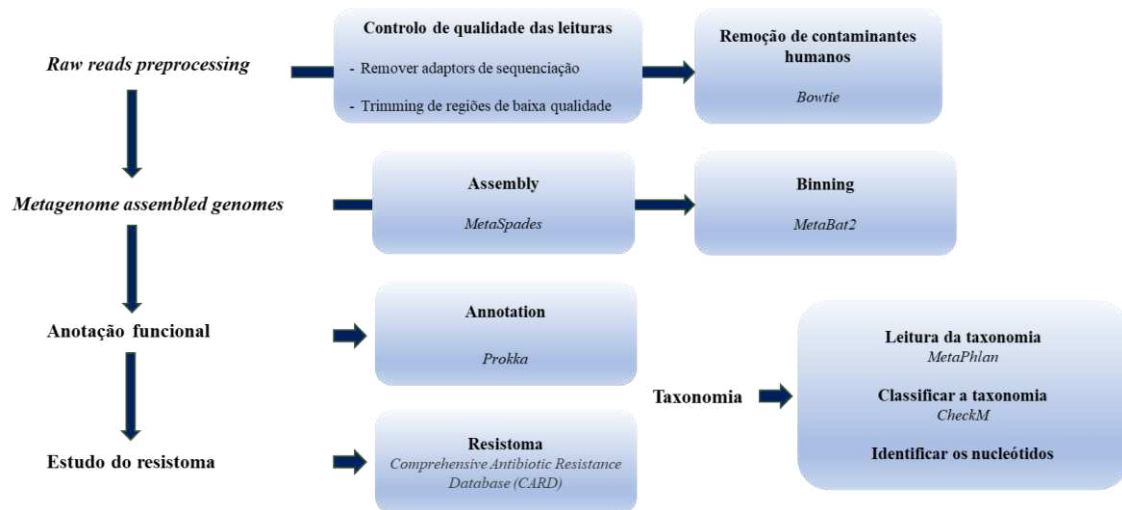


Figura 16 – Representação esquemática do fluxo de trabalho e ferramentas bioinformáticas usadas para obtenção dos resultados de cada amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método selecionado para recolha das amostras de biofilme subgengival

Dos ensaios preliminares feitos em algumas amostras de 10 pacientes, para otimização do método de recolha de biofilme subgengival dos implantes, verificou-se que o método que consistia em usar quatro cones de papel mostrou ser o menos adequado para o nosso objetivo, pois não permitia recolha suficiente de amostra para posterior obtenção de DNA na concentração mínima desejada. Por outro lado, o método com a cureta exigia que se realizasse uma anestesia prévia através de anestésicos locais tais como a lidocaína ou a articaína e, aliado a isso, não proporcionou um aumento razoável na concentração do DNA extraído relativamente ao método anterior. Assim, selecionou-se como método mais adequado para recolher uma maior quantidade de amostra, o método em que se utilizavam três *periopapers* por implante, pois proporcionou de forma geral uma quantidade suficiente de DNA e resultados mais homogêneos entre as amostras testadas preliminarmente. Tendo assim, sido este último método o usado para as recolhas de todas as amostras do estudo. Contudo, como esperado a recolha de biofilme subgengival dos implantes saudáveis foi mais desafiante do que os implantes afetados por PI. E por essa razão, quando uma das amostras recolhidas do paciente não levava à obtenção de DNA suficiente ou com qualidade, todas as amostras desse paciente não eram usadas e esse paciente era eliminado do estudo.

3.2 Características demográficas e clínicas da amostra populacional

Este estudo iniciou-se com a recolha dos dados e avaliação das características clínicas de todos os pacientes que constituem a amostra populacional. As características demográficas e clínicas da população estudada são apresentadas na Tabela 2. Todos os pacientes recrutados foram alocados a um de dois grupos, grupo HI (pacientes só com implantes saudáveis) ou grupo PI (pacientes com coocorrência de implantes saudáveis e com PI). A população recrutada incluiu um total de 55 indivíduos, dos quais 10 forneceram amostras para os ensaios preliminares. E os restantes 45 foram usados para iniciar o estudo propriamente dito. Destes últimos, 38 pacientes (20 com implantes saudáveis e 18 com coocorrência de implantes saudáveis e com PI) proporcionaram a obtenção de amostras de DNA microbiano para prosseguir para a sequenciação

metagenômica de shotgun. Sete pacientes foram, portanto, descartados nesta fase, porque pelo menos uma das suas amostras não levou à obtenção de DNA microbiano suficiente.

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas do grupo HI e PI.

		Grupo HI (n =27)	Grupo PI (n=28)	p *
Gênero	Feminino	15 (45,5)	18 (54,5)	0,509 ^a
	Masculino	12 (54,5)	10 (45,5)	
Idade (anos)		59,3 ± 2,9	63,2 ± 1,9	0,265 ^b
Fumador	Sim	5 (38,5)	8 (61,5)	0,380 ^a
	Não	22 (52,4)	20 (47,6)	
Ex-fumador	Sim	6 (46,2)	7 (53,8)	0,808 ^a
	Não	21 (50,0)	21 (50,0)	
Medicação	Sim	18 (54,5)	15 (45,5)	0,322 ^a
	Não	9 (40,9)	13 (59,1)	
Doenças associadas	Sim	17 (50,0)	17 (50,0)	0,864 ^a
	Não	10 (47,6)	11 (52,4)	
Número de dentes remanescente		20,7 ± 1,5	14,2 ± 1,9	0,026 ^c
Número total de implantes dentários		3,1 ± 0,4	6,1 ± 0,7	0,001 ^c

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão ou n (%). Grupo HI: grupo implante saudável; Grupo PI: grupo implante saudável + implante com PI. *Valores obtidos a partir dos testes: ^a Teste do qui-quadrado; ^b Teste t-student; ^c Teste Mann-Whitney.

Relativamente ao género, o grupo HI incluía 15 indivíduos do sexo feminino e 12 do sexo masculino, enquanto o grupo PI tinha 18 indivíduos do sexo feminino e 10 do sexo masculino. Ambos os grupos tinham maior prevalência de indivíduos do sexo feminino, contudo, tendo em conta o teste do qui-quadrado podemos afirmar que esta diferença não é significativa, logo existe homogeneidade entre os grupos quanto ao parâmetro género.

A média de idades para o grupo HI corresponde a $59,3 \pm 2,9$ enquanto no grupo PI corresponde a $63,2 \pm 1,9$. Através do teste de normalidade Shapiro-Wilk (dado ser uma amostra populacional inferior a 30) verificámos que para a idade existe uma distribuição normal dos valores para um dos grupos (grupo PI) e no outro grupo (grupo HI) apesar de não existir uma distribuição normal, este apresenta uma certa flexibilidade verificada nos valores de simetria e curtose. Como tal, seguidamente usou-se o teste t-student que nos permitiu afirmar que, apesar de existir uma ligeira diferença entre a média das idades nos dois grupos, essa diferença não é significativa, pois o valor de p foi $> 0,05$.

Em relação aos hábitos tabágicos, havia maior prevalência de fumadores e ex-fumadores no grupo PI do que no Grupo HI, contudo, tendo em conta o teste qui-quadrado a diferença entre grupos não é significativa. Igualmente, relativamente à toma de medicação, a diferença entre grupos também não se revelou significativa. No que toca à presença de doenças associadas, verificou-se que existe homogeneidade entre os dois grupos e daí se concluir que também não existem diferenças significativas o que pode ser corroborado com o auxílio do teste qui-quadrado.

Por fim, relativamente à média de dentes remanescentes e à média de implantes dentários, através do teste de normalidade Shapiro-Wilk (dado ser uma amostra populacional inferior a 30), verificou-se que ambas as variáveis não apresentavam uma distribuição normal dos valores, daí se ter recorrido posteriormente ao teste de Mann-Whitney. Com este teste, comprovou-se que existia uma diferença significativa entre os valores do número de dentes remanescentes e do número total de implantes dentários em ambos os grupos, o que era expectável, visto ser esta diferença o critério de distinção entre os grupos.

Em suma, verificou-se homogeneidade entre os grupos no que diz respeito às características analisadas, com exceção do número total de implantes dentários e número dentes remanescentes, em que se verificaram diferenças significativas entre os grupos.

Até ao início de setembro de 2023, tinham sido obtidas um total de 94 amostras de DNA com concentração e qualidade suficientes para prosseguirem para a sequenciação metagenômica de shotgun. Dessas, 40 amostras foram obtidas de 20 pacientes do Grupo HI (duas amostras por paciente: saliva (sa) e de implante saudável(is)) e 54 amostras de 18 pacientes do grupo PI (três amostras por paciente: sa, is e de implante com PI(pi)). Recentemente, mais dois pacientes foram recrutados para integrar o Grupo PI, e aguardam-se ainda os resultados da concentração e qualidade de DNA obtido das amostras desses pacientes, uma vez que o objetivo final é ter 20 pacientes em cada grupo, cujas amostras recolhidas proporcionem a obtenção de amostras de DNA com concentração e qualidade desejadas, conforme mostrado na Figura 7. No entanto, já não foi possível incluir esses dois pacientes que faltam na análise de resultados feita no âmbito desta tese, mas que serão incluídos nos resultados finais do projeto que está a decorrer.

3.3 Composição taxonômica das amostras de dois pacientes

Para a obtenção da composição taxonômica da comunidade microbiana das amostras em estudo, recorreu-se à análise da sequenciação metagenômica de shotgun. Algumas amostras de DNA que passaram o controlo de qualidade, já foram submetidas à sequenciação metagenômica de shotgun. Essa análise metagenômica gera uma enorme quantidade de dados, que tem de ser trabalhada com ajuda de ferramentas bioinformáticas. Portanto, toda esta análise bioinformática é morosa e por isso, no âmbito desta tese, apenas será possível apresentar os resultados da composição taxonômica e da presença de ARGs das amostras de dois pacientes. Um paciente pertencente ao grupo HI (paciente 10) e outro pertencente ao grupo PI (paciente 21) e cujas características clínicas de ambos se encontram demonstradas na Tabela 3. A escolha destes pacientes foi aleatória apenas com a condição que teria de cada um deles pertencer a grupos distintos.

Tabela 3 – Características clínicas dos pacientes 10 e 21.

		Paciente 10 (grupo HI)	Paciente 21 (grupo PI)
Gênero		Masculino	Feminino
Idade		57 anos	61 anos
Fumador		Não	Não
Ex-fumador		Sim	Não
Doenças associadas		Sim (hipercolesterolemia)	Não
Medicação		Sim (sinvastatina)	Não
Número de dentes remanescentes		28	0
Número de implantes dentários	Saudáveis	1	4
	Com PI	0	6

Grupo HI: grupo implante saudável; Grupo PI: grupo implante saudável + implante com PI.

A análise metagenômica feita de acordo com o esquematizado na Figura 16 (ver métodos), permitiu obter os detalhes de processamento e os MAGs para as amostradas sequenciadas dos dois pacientes, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Processamento das sequências obtidas por análise metagenômica de shotgun: eliminação das *reads* de baixa qualidade e das *reads* do DNA humano e obtenção de MAGs após montagem e *binning*.

Amostras	Nº total de <i>raw reads</i>	Nº de <i>reads</i> após remoção de <i>adaptors</i> e <i>trimming</i>	% de <i>reads</i> de elevada qualidade	Nº de <i>reads</i> após remoção de <i>reads</i> do hospedeiro	% de <i>reads</i> usadas para obtenção de MAGs	Nº de MAGs
10sa	4968672	4568697	92,0%	4554886	99,7%	23
10is	7235287	6576929	90,9%	6079280	92,4%	13

21sa	12297747	11197577	91,1%	9171649	81,9%	23
21pi	7063587	6425922	91,0%	2883747	44,9%	9
21is	7599390	6947345	91,4%	3183858	45,8%	13

Seguidamente, foram obtidos os resultados da composição taxonómica, via MetaPhlAn (ver secção 2.6. dos métodos), para cada amostra.

3.3.1 Abundância relativa do microbioma de cada amostra do paciente 10

O paciente 10 corresponde a um paciente com implantes dentários que após a avaliação clínica e radiográfica foram considerados saudáveis.

Após atribuição taxonómica, as abundâncias relativas de cada taxa identificado em cada amostra foram avaliadas. Foram obtidas as abundâncias relativas ao nível do filo (Figura 17), do género (Figura 18) e da espécie (Figura 19) presentes em cada uma das amostras, isto é, na saliva (10sa) e no biofilme subgengival de implante saudável (10is), de forma a averiguar as principais semelhanças e diferenças em termos de composição e abundância.

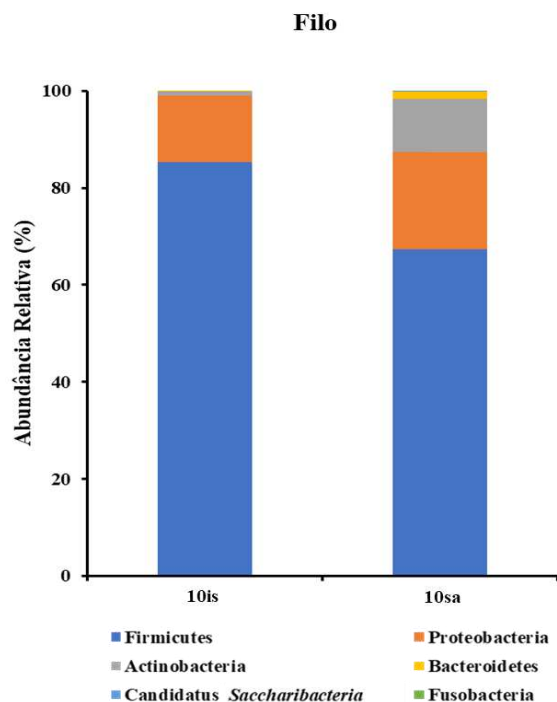


Figura 17 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do filo das amostras (10is e 10sa) do paciente 10.

Os quatro filos mais abundantes identificados em ambas as amostras (implante saudável – 10is e saliva – 10sa) foram Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes (Figura 17). Outros estudos reportaram também estes quatro filos como aqueles que se encontram no biofilme subgengival de implantes saudáveis (Son et al., 2023; Zheng et al., 2015).

Para além disso, na amostra de saliva mais dois filos foram detetados, *Candidatus Saccharibacteria* e *Fusobacteria*. A abundância relativa de Firmicutes na amostra subgengival do implante saudável foi superior à encontrada na amostra de saliva. Em contrapartida a abundância relativa de Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes foi superior na amostra de saliva quando comparada com a amostra subgengival.

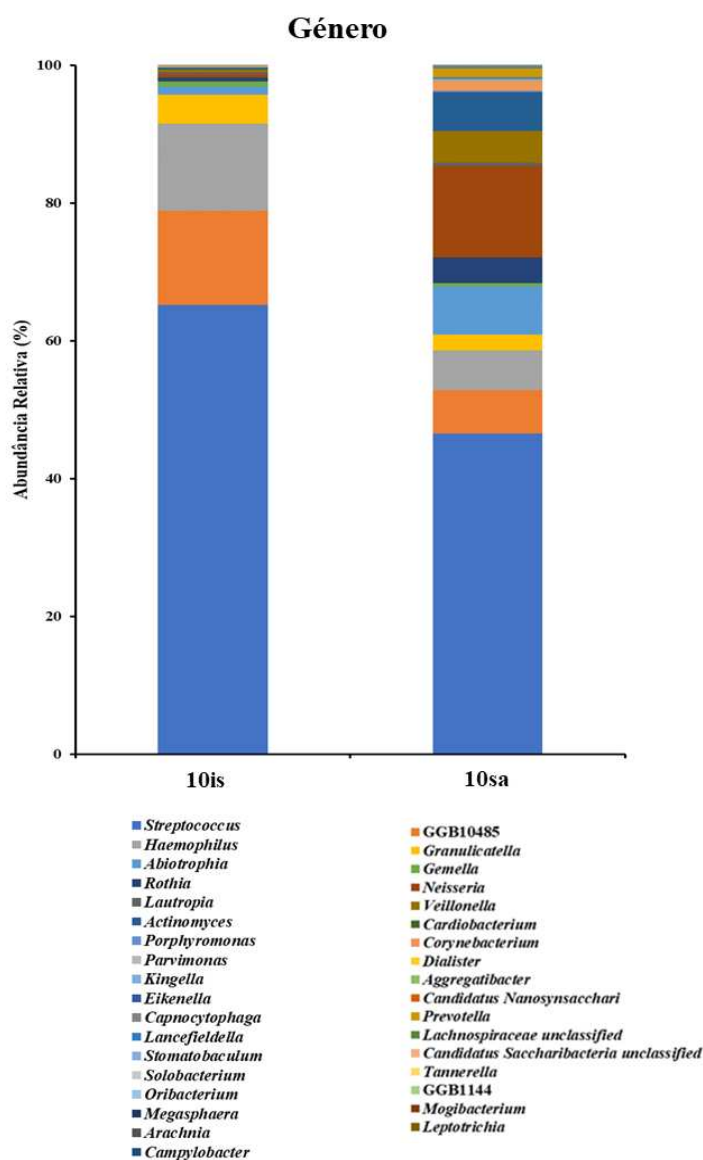


Figura 18 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do género das amostras (10is e 10sa) do paciente 10.

Ao nível do género, os cinco géneros mais abundantes identificados foram *Streptococcus*, GGB10485, *Haemophilus*, *Granulicatella* e *Abiotrophia*, que correspondem a mais de 50% da comunidade bacteriana de ambas as amostras (Figura 18). Destes cinco géneros, aquele que normalmente é mais relatado em diversos estudos com uma grande abundância em amostras de implantes saudáveis é o género *Streptococcus* (Kensara et al., 2023; Son et al., 2023). Então, de uma forma geral, o género *Streptococcus* tem sido associado à saúde peri-implantar (Dabdoub et al., 2013; Kumar et al., 2012).

A taxonomia foi obtida com o MetaPhlan. Este programa utiliza as sequências provenientes do sequenciador e mapeia nos genomas que estão na base de dados mpa_vOct22_CHOCOPhAnSGB_202212. Esta base de dados foi construída a partir da análise de um conjunto de 9428 metagenomas, e de onde se reconstruíram os genomas de 154723 genomas microbianos. Deste trabalho resultaram 4930 species-level genome bins (SGBs), mas destes, 77% não apresentaram correspondência com genomas existentes em repositórios públicos e por isso são SGBs desconhecidos (Pasolli et al., 2019). A designação GGB provém do mesmo estudo e indica “genus-level genome bins”. Por exemplo no caso do “GGB10485”, o que se conseguiu obter em termos de taxonomia reconhecida é que pertence à família Enterococcaceae.

A abundância relativa dos géneros *Streptococcus*, GGB10485, *Haemophilus* e *Granulicatella* ao nível da amostra subgengival do implante saudável foi superior quando comparado com a amostra de saliva, por outro lado a abundância relativa de *Abiotrophia* foi superior na amostra de saliva.

Através da análise da Figura 18, podemos também constatar que a amostra de saliva apresenta uma comunidade bacteriana aparentemente mais diversificada em termos de género quando comparada com a presente no implante saudável. No entanto, índices de diversidade, nomeadamente de beta diversidade, não foram determinados nesta fase. Serão calculados posteriormente quando os dados de todas as amostras de todos os pacientes estiverem disponíveis. Para além disso, podemos também verificar através da análise da coluna representativa da amostra de saliva que há três géneros em grande abundância (*Neisseria*, *Veillonella* e *Actinomyces*) e os mesmos, por sua vez, apresentam-se em baixa abundância na amostra subgengival do implante saudável.

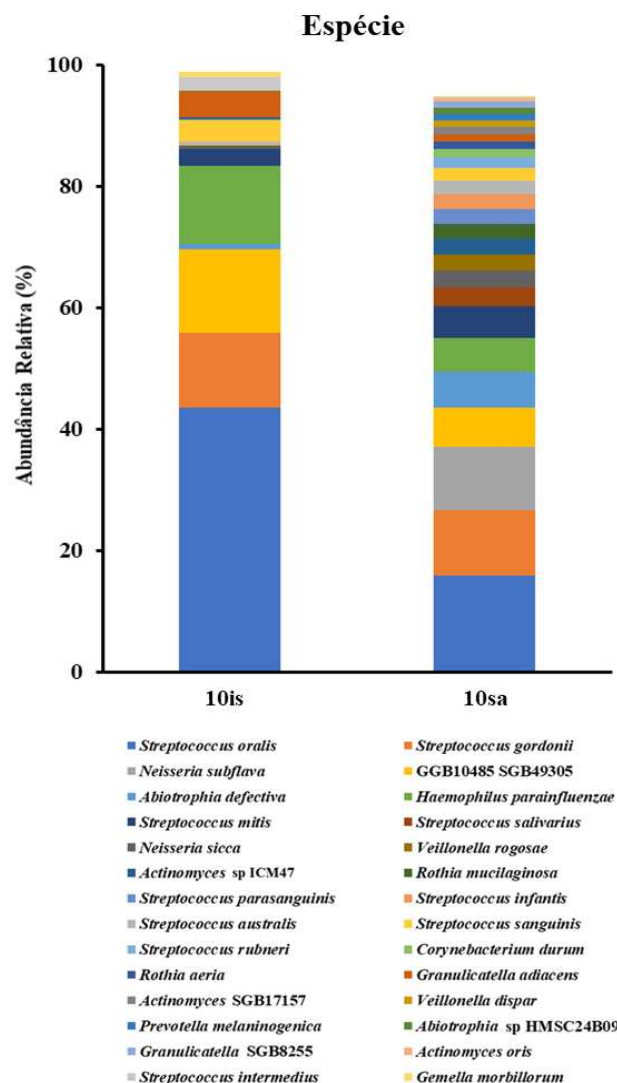


Figura 19 – Abundância relativa da composição microbiana a nível da espécie relativamente ao paciente 10. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 0,5 de abundância relativa.

Ao nível da espécie, as sete mais abundantes espécies encontradas em ambas as amostras foram *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, GGB10485 SGB49305, *Haemophilus parainfluenzae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Granulicatella adiacens* (Figura 19).

A taxonomia GGB10485 SGB49305 significa que as sequências mapearam num SGB reconstruído do estudo mencionado mas em que não conseguiram identificar o nível taxonómico nem da espécie, nem do género, apenas que pertence à família Enterococcaceae (Pasolli et al., 2019).

A abundância relativa das espécies mencionadas anteriormente foi superior na amostra subgingival do implante saudável exceto a espécie *Streptococcus mitis* que foi superior na amostra de saliva.

Analisando mais em pormenor a coluna representativa da amostra de saliva, podemos verificar que a espécie *Abiotrophia defectiva* encontra-se em grande abundância nesta amostra, mas não na amostra subgingival do implante saudável, onde se apresenta em baixa abundância. Para além desta espécie, a espécie *Neisseria subflava* apresenta grande abundância na amostra de saliva sendo inexistente na coluna representativa do implante saudável.

É claramente visível, que há uma variedade/diversidade maior na amostra da saliva do que na do implante saudável.

3.3.2 Abundância relativa do microbioma de cada amostra do paciente 21

Foram também obtidas as abundâncias relativas ao nível do filo (Figura 20), do género (Figura 21) e da espécie (Figura 22) presentes em cada uma das amostras do paciente 21, isto é, na saliva (21sa), no biofilme subgingival de implante saudável (21is), e no biofilme subgingival de implante com PI (21pi).

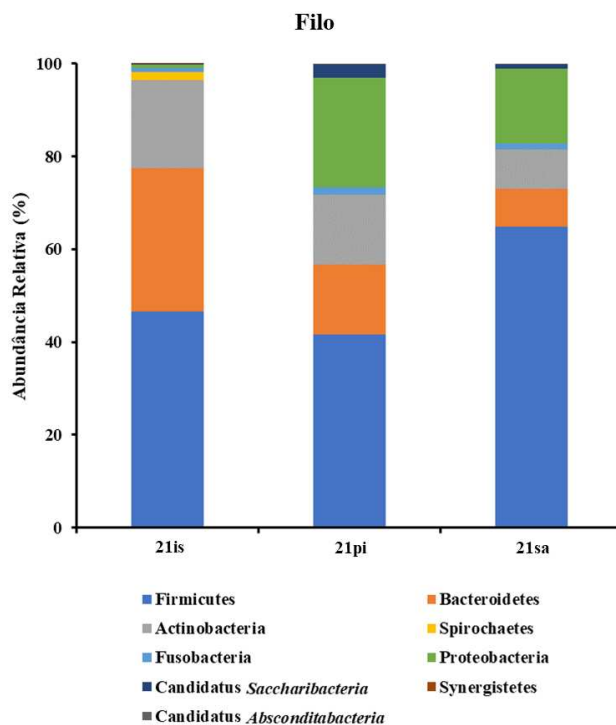


Figura 20 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do filo das amostras (21is, 21pi e 21sa) do paciente 21.

Os três filos mais abundantes em todas as amostras foram Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (Figura 20) correspondendo a mais do que 50% da comunidade bacteriana presentes em cada uma das três amostras.

Destes filos, Bacteroidetes e Actinobacteria foram mais abundantes nas amostras dos implantes, tanto do saudável como do com PI, quando comparado com a amostra de saliva. O filo Firmicutes encontra-se com maior abundância na saliva.

Por outro lado, a amostra 21sa e 21pi apresentavam uma grande abundância do filo Proteobacteria que existe em baixa quantidade na amostra 21is.

Analisando em particular o filo Spirochaetes, este apenas se encontra na amostra 21is e 21sa, sendo inexistente na amostra 21pi.

No entanto, analisando agora o filo Candidatus *Absconditabacteria*, este apenas se encontra nas amostras 21pi e 21sa, sendo, por sua vez, inexistentes na amostra 21is.

Os dados obtidos na nossa análise vão de encontro com os obtidos no estudo de Kim et al., (2023) que através do sequenciamento 16S rRNA de amostras de saliva e de implantes diagnósticas com PI recolhidas com curetas de Gracey, também verificou que nas amostras subgengivais de implantes existia uma abundância relativa maior dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria. Também a investigação realizada por Al-Ahmad et al., (2018) permite ir de encontro com os dados que obtivemos na amostra 21is, com os filos mais abundantes Firmicutes e Bacteroidetes.

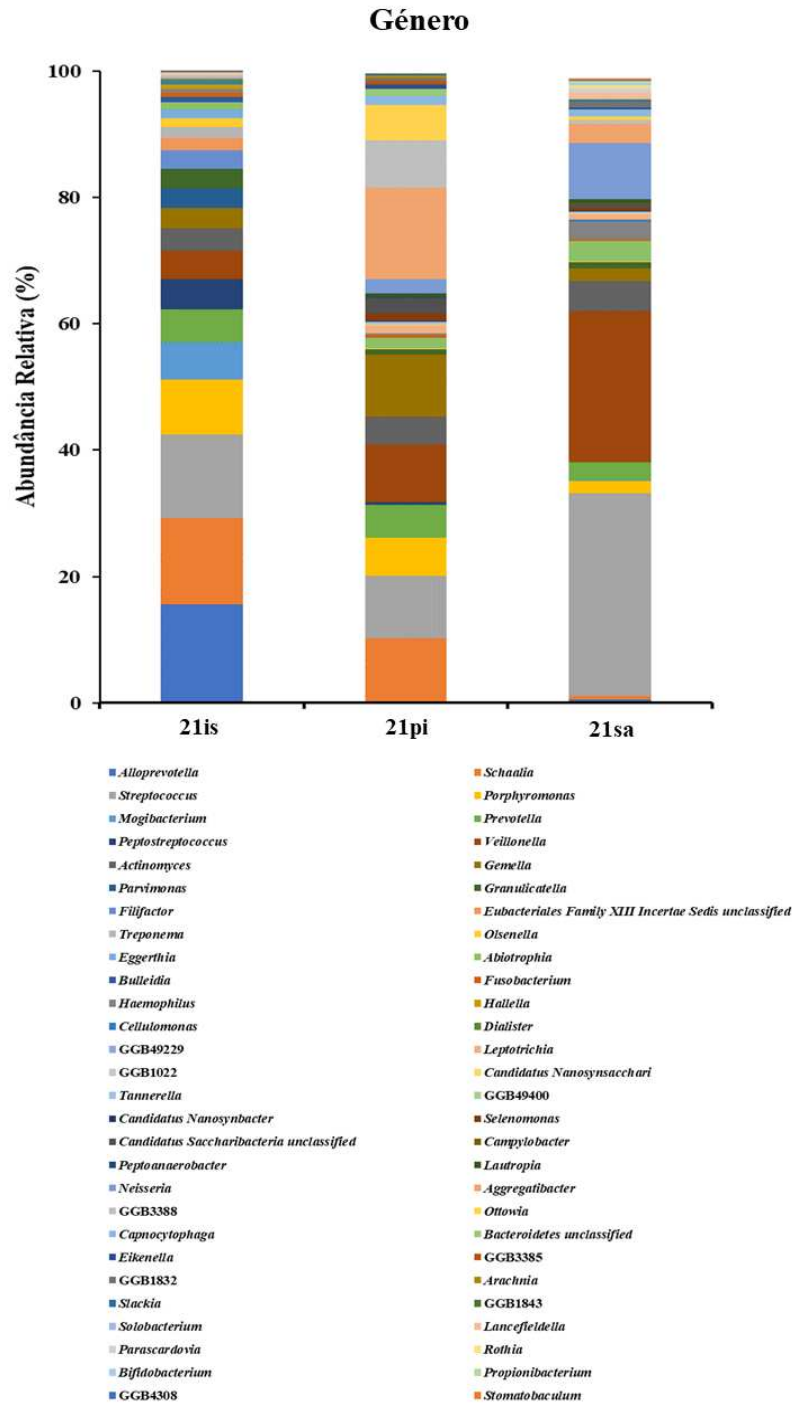


Figura 21 – Abundância relativa da composição microbiana a nível do gênero das amostras (21is, 21pi, 21sa) do paciente 21. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 0,1 de abundância relativa.

Após análise da Figura 21, destacam-se sete gêneros mais abundantes nas três amostras: *Schaalia*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Actinomyces* e *Gemella*.

A abundância relativa dos géneros *Schaalia*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Gemella* foi superior ao nível das amostras de biofilme subgengival, quer de implante saudável quer de implantes com PI, quando comparada com a abundância relativa na amostra de saliva. Por outro lado, os restantes géneros mais abundantes (*Streptococcus*, *Veillonella* e *Actinomyces*) apresentam uma maior abundância na amostra de saliva em relação às amostras de biofilme subgengival de ambos os implantes.

Para além destes três, também o género *Neisseria* apresenta grande abundância na amostra de saliva encontrando-se em baixa abundância em ambas as amostras de biofilme subgengival.

A amostra de biofilme subgengival do implante saudável apresenta em grande abundância o género *Alloprevotella* que se encontra em baixa abundância nas amostras do implante com PI e de saliva.

Na amostra de biofilme subgengival do implante com PI podemos destacar a abundância dos géneros *Aggregatibacter*, GGB3388 e *Ottowia* que não se encontram na amostra de biofilme subgengival do implante saudável e que na amostra de saliva se encontram em baixa abundância.

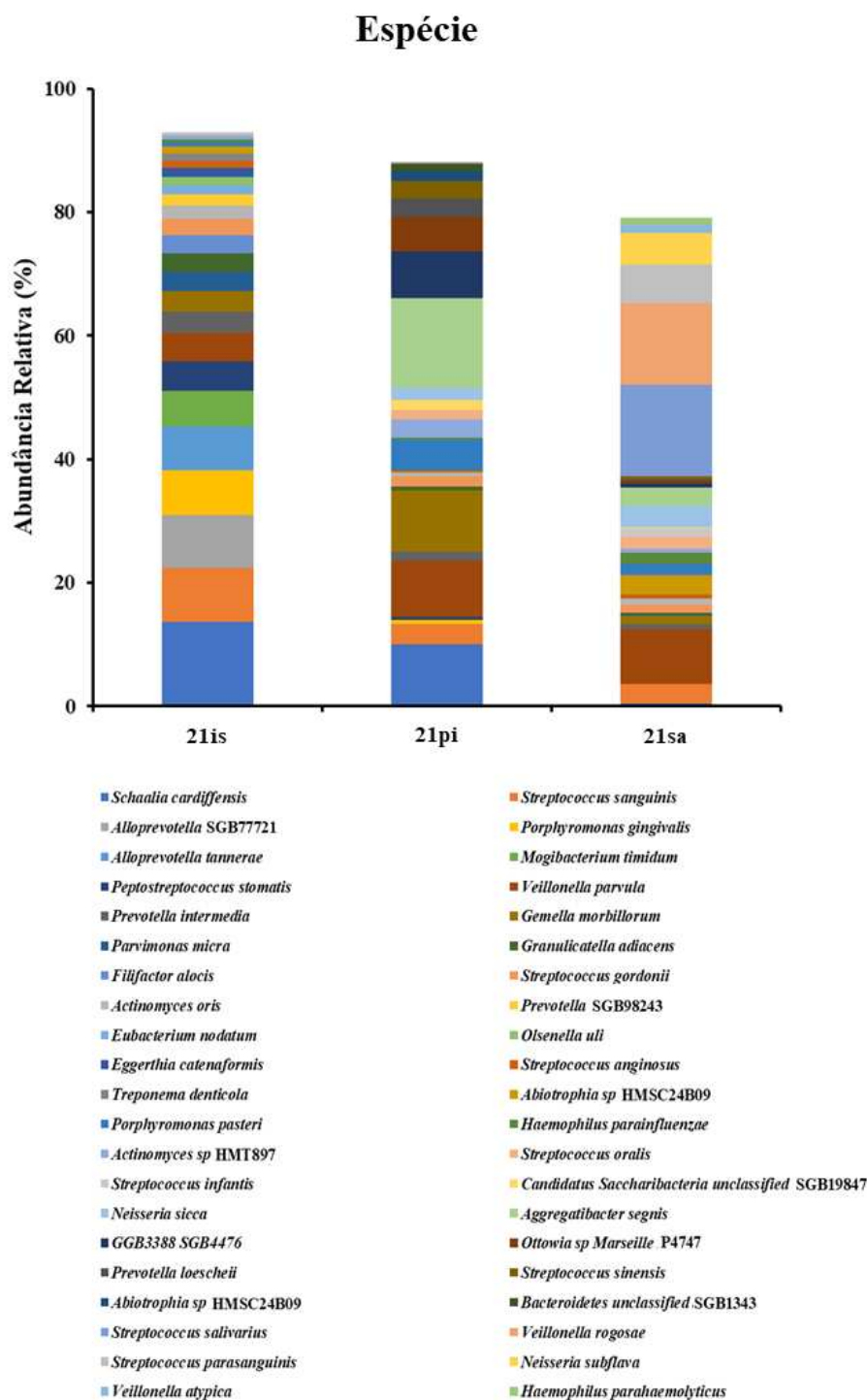


Figura 22 – Abundância relativa da composição microbiana a nível da espécie das amostras (21is, 21pi e 21sa) do paciente 21. Na elaboração deste gráfico incluíram-se os valores acima de 1 de abundância relativa.

As espécies mais abundantes encontradas nas três amostras incluem: *Schaalia cardiffensis*, *Streptococcus sanguinis*, *Veillonella parvula*, *Gemella morbillorum* e *Streptococcus gordonii*. Relativamente à espécie *Schaalia cardiffensis*, esta encontra-se com maior abundância nas amostras dos implantes dentários do que na amostra de saliva.

As bactérias pertencentes ao género *Schaalia*, encontram-se em grande abundância na cavidade oral em condições de saúde, correspondendo a cerca de 3-6% da comunidade microbiana oral (Nouioui et al., 2018). Segundo Eren et al., (2014), podemos encontrar na cavidade oral nove espécies pertencentes a este género no entanto nas amostras do paciente 21 apenas foram identificadas cinco delas: *Schaalia cardiffensis*, *Schaalia georgiae*, *Schaalia lingnae*, *Schaalia meyeri* e *Schaalia odontolytica* (dados não apresentados na Figura 22 para as últimas quatro).

Relativamente à amostra 21is, destacam-se diversas espécies cuja presença nas amostras 21pi e 21sa é praticamente inexistente ou até mesmo inexistente, sendo essas *Alloprevotella* SGB77721, *Porphyromonas gingivales*, *Alloprevotella tanneriae*, *Mogibacterium timidum* e *Peptostreptococcus stomatis*.

Na amostra 21pi existe uma grande abundância de *Agreggatibacter segnis*, GGB3388 SGB4476 e *Ottowia sp Marseille* P4747, que por sua vez, se encontram em baixa abundância na amostra 21sa e são inexistentes na amostra 21is. Em relação à espécie *Agreggatibacter segnis*, esta é um comensal que se encontra muitas vezes na orofaringe e tem a capacidade de colonizar as mucosas orais (Guo et al., 2023; Nørskov-Lauritsen, 2014). Apresenta alguma relevância clínica, na medida em que é responsável pelo aparecimento de alguns casos de endocardite bacteriana (Guo et al., 2023).

Por fim, destaca-se a presença de *Streptococcus salivarius* e *Veillonella rogosae* em grande abundância na saliva (21sa), sendo inexistentes na amostra 21is e existindo em baixa abundância na amostra 21pi.

Segundo Kumar et al., (2012), em casos de doença peri-implantar existe uma menor diversidade na comunidade microbiana quando comparada à de implantes saudáveis. Noutro estudo, feito *in vitro* foram visíveis contagens mais elevadas de bactérias em amostras de biofilme de implantes com PI do que em amostras de biofilme de implantes saudáveis (Souza et al., 2021).

Como já foi referido anteriormente, a PI é mediada por um biofilme polimicrobiano sendo composto por bactérias anaeróbias uma vez que, como a PI ocorre numa bolsa peri-implantar profunda, existe uma privação de oxigénio o que não favorece o crescimento de bactérias aeróbias (Charalampakis & Belibasakis, 2015). Estudos têm associado ao microbioma da PI bactérias Gram-positivas anaeróbicas como *Eubacterium* spp. e bactérias Gram-negativas anaeróbicas como *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* (Alves et al., 2022; Kensara et al., 2021). No caso do paciente 21, apenas identificámos *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, sendo que as restantes espécies bacterianas não apresentam abundância relativa, sendo mesmo inexistentes nas amostras representativas do implante com PI (Figura 22).

3.4 Comparação das comunidades bacterianas das amostras dos dois pacientes

Iniciando pelo filo, verifica-se que nas amostras de ambos os pacientes há abundância de três filos: Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria (Figuras 17 e 20). Contudo, no paciente 10 (grupo HI) verificou-se uma maior abundância do filo Firmicutes na amostra de implante saudável, enquanto no paciente 21 (grupo PI) verificou-se uma maior abundância deste na amostra de saliva. Por outro lado, no paciente 10 verificou-se uma maior abundância dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria na amostra de saliva, mas no paciente 21 a maior abundância destes filos foi nas amostras dos implantes saudável e com PI.

Através de uma análise mais particular da Figura 20 referente ao paciente 21, podemos verificar que o filo *Candidatus Absconditabacteria* apenas se encontra em duas amostras, na amostra de saliva e na amostra do implante com PI. Em contrapartida, verifica-se que o filo *Spirochaetes* apenas se encontra na amostra de saliva e na do implante saudável. Logo, caso tivéssemos mais dados de outros pacientes e se verificassem as mesmas condições, a presença destes filos em amostras de saliva permitiria avaliar a presença ou não de doença peri-implantar. Mas, neste momento, não é possível concluir isso.

Passando para a análise do género, verifica-se que há apenas um género que é comum às amostras dos dois pacientes, sendo esse o género *Streptococcus*.

Analisando mais ao pormenor cada uma das amostras, podemos afirmar que os géneros *Streptococcus* e *Haemophilus* no paciente 10 apresentam maior abundância na amostra 10is e no paciente 21 apresentam maior abundância na amostra 21sa seguida da amostra 21is. Os géneros como *Abiotrophia*, *Veilonella* e *Actinomyces*, em ambos os pacientes, apresentam maior abundância na amostra da saliva, e além disso, no paciente

21 a abundância destes géneros é superior na amostra do implante com PI do que na amostra do implante saudável.

Relativamente as espécies mais abundantes nas amostras de ambos os pacientes, apenas podemos destacar duas delas, o *Streptococcus gordonii* e o *Streptococcus sanguinis*.

Por meio de uma análise mais detalhada das Figuras 19 e 22, podemos concluir que existem algumas espécies com uma grande abundância nas amostras de implantes saudáveis tanto para o paciente 10 como para o paciente 21, sendo elas o *Streptococcus sanguinis* e a *Granulicatella adiacens*. Por outro lado, a espécie *Neisseria subflava*, tanto nas amostras do paciente 10 como do paciente 21, só apresenta abundância nas amostras de saliva sendo inexistente em todas as amostras de implantes.

Analisando os resultados das amostras dos implantes saudáveis de ambos os pacientes, verificamos que a espécie *Streptococcus gordonii* apresenta uma grande abundância nestas amostras e uma menor abundância nas amostras de saliva e do implante diagnosticado com PI. Conclui-se que existem diferenças na composição taxonómica entre o implante saudável e o implante com PI existentes na mesma cavidade oral, mas sendo apenas com a análise de amostras de dois pacientes, ainda não é possível chegar a conclusões definitivas.

Tem sido reportado que a comunidade bacteriana dos locais com PI apresenta uma comunidade bacteriana mais abundante em termos de espécies (Charalampakis & Belibasakis, 2015; Nguyen-Hieu et al., 2012; Sanz-Martin et al., 2017). Isto pode dever-se ao facto de aquando ocorre inflamação esta provoca danos nos tecidos originando uma fonte de nutrientes para os microrganismos, logo estes começam a proliferar (Hajishengallis et al., 2012).

3.5 Genes de resistência aos antibióticos

Um dos grandes problemas da saúde pública são o desenvolvimento e rápida propagação da resistência aos antibióticos daí se ter apontado como um dos objetivos do trabalho, avaliar a presença de ARGs nas amostras sequenciadas. Tendo, por isso, sido obtida essa informação para as amostras dos pacientes 10 e 21. A presença desses genes foi avaliada com recurso ao CARD.

Em medicina dentária, os antibióticos que são mais frequentemente prescritos são a amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico (classe dos beta-lactâmicos), azitromicina (macrólido), clindamicina (lincomicina), metronidazol (nitroimidazol) ciprofloxacina (quinolona), a gentamicina (aminoglicosídeo) e tetraciclina daí, a necessidade de se fazer esta monitorização para dar instruções de como usar adequadamente os antibióticos em pacientes com PI de forma a melhorar a eficácia do seu tratamento (Kang et al., 2021; Oberoi et al., 2015). Para além disto, aquando da remoção do biofilme subgengival de forma cirúrgica ou não cirúrgica, se este não for totalmente eliminado a ação do agente antimicrobiano não será tão eficaz e, por isso existe uma maior probabilidade que haja o desenvolvimento de resistências bacterianas (Verdugo et al., 2016).

Na Tabela 5, são apresentados os ARGs que foram identificados nos MAGs de cada amostra.

Tabela 5 – Principais tipos de ARGs encontrados nas amostras dos dois pacientes.

	Paciente 10		Paciente 21		
	10is	10sa	21is	21pi	21sa
<i>patA</i>	4	3	1	1	2
<i>patB</i>	4	2	1	1	2
<i>pmrA</i>	1				
gene <i>vanY</i> em van clusters	9	9	2	1	5
gene <i>vanT</i> em van clusters	2	5	5	3	9
gene <i>vanH</i> em van clusters	2	1	2		
gene <i>vanW</i> em van clusters	1	1	2	2	4

<i>vanG</i>			1		
<i>qacG</i>	3	3	1	2	5
<i>Hinf_PBP3_BLA</i>	1	1		1	2
<i>pgpB</i>			1		
<i>ErmF</i>			1		1
<i>tet(M)</i>			1		1
<i>mdeA</i>				1	2
<i>Ecol_EFTu_PLV</i>					1
<i>Kpne_KpnH</i>				1	1
<i>CfxA2</i>				1	
<i>qacJ</i>					1
<i>tet(B)</i>					1
<i>tetR</i>					1
<i>catQ</i>					1

As cores indicam a % de identidade com a respectiva sequência do MAG. Os números indicam o número de MAGs de cada amostra em que cada ARG foi identificado.

	100%
	> 75%
	< 75%

Na Tabela 6, encontra-se um resumo sobre a família a que cada ARG pertence, a(s) classe(s) de fármacos para os quais conferem resistência e o mecanismo de resistência.

Tabela 6 – Características dos ARGs encontrados nas amostras analisadas.

ARGs	Família do gene que confere resistência	Classe de fármacos	Mecanismo de resistência
<i>patA</i>	Cassete de ligação de ATP (ABC) bombas de efluxo	Fluoroquinolonas	Efluxo do antibiótico
<i>patB</i>	Cassete de ligação de ATP (ABC) bombas de efluxo	Fluoroquinolonas	Efluxo do antibiótico
<i>pmrA</i>	Superfamília de facilitadores (MFS) bombas de efluxo	Fluoroquinolonas	Efluxo do antibiótico
<i>VanT, VanY, vanH, vanW</i>	Clusters de genes de resistência aos glicopéptdeos	Glicopéptdeos	Alteração do alvo do antibiótico
<i>vanG</i>	Cluster de genes de resistência aos glicopéptdeos, Van Ligase	Glicopéptdeos	Alteração do alvo do antibiótico
<i>qacG</i>	Multirresistência (SMR) bombas de efluxo	Agentes desinfetantes e antissépticos	Efluxo do antibiótico
<i>Hinf_PBP3_BLA</i>	Mutações nas PBPs, conferindo resistência aos beta-lactâmicos	Cefalosporinas, Cefamicinas e penamos	Alteração do alvo do antibiótico
<i>pgpB</i>	Fosfatase lípido A	Antibióticos peptídicos	Alteração do alvo do antibiótico
<i>ErmF</i>	Erm 23S ribossomal RNA metiltransferase	Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas	Alteração do alvo do antibiótico
<i>tet(M)</i>	Proteínas que conferem resistência às tetraciclina por proteção ribossomal	Tetraciclina	Proteção do alvo do antibiótico
<i>mdeA</i>	Superfamília de facilitadores (MFS) bombas de efluxo	Fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, penamos, tetraciclina, agentes desinfetantes e antissépticos	Efluxo do antibiótico
<i>Ecol_EFTu_PLV</i>	Elfamicina EF-Tu resistente	Elfamicinas	Alteração do alvo do antibiótico

<i>Kpne_KpnH</i>	Superfamília de facilitadores (MFS) bombas de efluxo	Macrólidos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, carbapenemos, cefalosporinas, penamos, antibióticos peptídicos	Efluxo do antibiótico
<i>CfxA2</i>	CfxA beta-lactamase	Cefamicinas	Inativação do antibiótico
<i>qacJ</i>	Multirresistência (SMR) bombas de efluxo	Agentes desinfetantes e antissépticos	Efluxo do antibiótico
<i>tet(B)</i>	Superfamília de facilitadores (MFS) bombas de efluxo	Tetraciclina	Efluxo do antibiótico
<i>tetR</i>	Superfamília de facilitadores (MFS) bombas de efluxo	Tetraciclina	Alteração do alvo do antibiótico e efluxo do antibiótico
<i>catQ</i>	Cloranfenicol acetiltransferase (CAT)	Fenicolis	Inativação do antibiótico

Analisando a Tabela 5, percebe-se que nas amostras dos dois pacientes foram identificados vários ARGs, tendo alguns maior % de certeza de identidade que outros e que, os pacientes tinham pelo menos um ou mais ARGs correspondentes a pelo menos uma classe de antibióticos.

Os ARGs *patA* e *patB*, que conferem resistências às fluoroquinolonas e cujo mecanismo de ação está relacionado com o efluxo do antibiótico através das bombas de efluxo, encontraram-se tanto no paciente 10 como no paciente 21 e em todas as amostras (10is, 10sa, 21is, 21pi e 21sa).

Relativamente aos ARGs *vanY*, *vanT* e *vanW* em *van* clusters que conferem resistência aos glicopéptidos e ao *qacG* que proporciona resistência aos agentes desinfetantes e antissépticos, também se encontraram em todas as amostras dos dois pacientes (10is, 10sa, 21is, 21pi e 21sa), contudo a sua percentagem de identidade foi menor relativamente aos ARGs mencionados anteriormente.

Dos ARGs encontrados, existem alguns que apenas se encontram num tipo de amostra como o *pmrA* que apenas se encontrou na amostra do implante saudável do paciente 10 (amostra 10is). Por outro lado, o *vanG* e o *pgpB*, ambos com o mesmo mecanismo de ação de alterar o alvo do antibiótico, encontram-se apenas nas amostras do

implante saudável do paciente 21 (amostra 21is), sendo que o *vanG* apresenta uma identidade menor quando comparado com o *pgpB*.

Em relação ao *Hinf_PBP3_BLA* encontra-se em todas as amostras, exceto na amostra do implante saudável do paciente 21 (amostra 21is).

Existem alguns ARGs que apenas se encontram presentes no paciente 21, nomeadamente o *pgpB* (apenas na amostra 21is), o *EmrF* e *tet(M)* (presentes nas amostras 21is e 21sa), *mdeA* e *Kpne_KpnH* (presentes nas amostras 21pi e 21sa), *CfxA2* (presente apenas na amostra 21pi) e por fim, *Ecol_EFTu_PLV*, *qacJ*, *tet(B)*, *tetR* e *catQ* (presentes apenas na amostra 21sa).

Por fim, analisando todos os ARGs presentes, podemos afirmar que aqueles que foram identificados com total entidade foram: 1) *CfxA2* (presente na amostra 21pi) que confere resistência às cefamicinas por codificar para a CfxA beta-lactamase que inativa o antibiótico e 2) *tetR* (presente na amostra 21sa) que confere resistência às tetraciclinas e que provoca a alteração do efluxo do antibiótico.

De forma a se evitar que os pacientes desenvolvam resistências aos antibióticos e superinfecções, devemos de certa forma monitorizar e ir analisando a sua história clínica de forma a verificar quais os fármacos que este tomou no passado, em particular quais os antibióticos que já lhe foram prescritos (Verdugo et al., 2016).

3.6 Limitações do estudo

No âmbito deste trabalho de tese, e no espaço de tempo planeado para a sua execução, não foi possível obter os resultados da sequenciação metagenómica de shotgun das amostras de todos os pacientes. Aliás, isso já tinha sido antecipado no planeamento. Portanto, das 100 amostras que serão sequenciadas, obtidas de 40 pacientes (20 do grupo Hi e 20 do grupo PI), apenas cinco amostras (obtidas de pacientes de cada grupo) foram analisadas até este momento.

A análise destas cinco amostras não permite naturalmente chegar a conclusões com carácter significativo ou definitivo, dado existir a necessidade realizar este mesmo estudo recorrendo à comparação de um maior número de pacientes de forma a se originar uma imagem confiável da composição microbiana de ambos os grupos para se conseguir

fazer uma boa associação entre a presença de determinadas bactérias e o estado clínico no qual se encontra o implante dentário.

4 CONCLUSÃO

A recolha de amostras de biofilme gengival de implantes dentários pode ser bastante desafiante, logo a realização de ensaios preliminares foi essencial para se conseguir otimizar a amostragem subgengival dado que, vários protocolos de amostragem existentes na literatura não se mostraram adequados ao nosso objetivo (extrair DNA microbiano total na concentração e qualidade necessárias para posterior análise de sequenciação metagenómica de shotgun).

No total deste trabalho, 55 pacientes foram recrutados para recolha de amostras. Destes pacientes, 10 providenciaram amostras usadas nos ensaios preliminares e os restantes 45 foram incluídos no estudo propriamente dito. Relativamente aos dados demográficos e clínicos dos pacientes, não existiram diferenças significativas nas variáveis analisadas com exceção do número de dentes e número de implantes o que era expectável pois era um dos critérios de distinção. Assim sendo, os dois grupos de estudo (grupo HI e grupo PI) foram considerados homogéneos quanto às características dos pacientes.

Tendo em conta os resultados obtidos relativamente à composição taxonómica das amostras de dois pacientes (paciente 10 e paciente 21), verificaram-se algumas diferenças em termos de abundâncias relativas sobretudo ao nível da espécie. Uma vez, que apenas amostras de dois pacientes, um de cada grupo de estudo, foram analisadas no âmbito deste trabalho de tese, não foi possível obter conclusões definitivas e relevantes cientificamente acerca da composição taxonómica representativa de saúde e doença peri-implantar.

Vários ARGs foram identificados nas amostras dos pacientes em estudo. Houve maior diversidade de ARGs encontrados nas amostras do paciente 21 do que nas amostras do paciente 10. Dos ARGs identificados no paciente 21, podemos destacar dois em particular, *CfxA2* e *tetR*. Em que o primeiro confere resistência às cefamicinas enquanto o segundo está implicado na resistência aos antibióticos da classe das tetraciclina.

5 BIBLIOGRAFIA

- Al-Ahmad, A., Muzafferiy, F., Anderson, A. C., Wölber, J. P., Ratka-Krüger, P., Fretwurst, T., Nelson, K., Vach, K., & Hellwig, E. (2018). Shift of microbial composition of peri-implantitis-associated oral biofilm as revealed by 16S rRNA gene cloning. *Journal of Medical Microbiology*, 67(3), 332–340.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000682>
- Al-Hebshi, N. N., Baraniya, D., Chen, T., Hill, J., Puri, S., Tellez, M., Hasan, N. A., Colwell, R. R., & Ismail, A. (2019). Metagenome sequencing-based strain-level and functional characterization of supragingival microbiome associated with dental caries in children. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1557986>
- Almeida, V. D. S. M., Azevedo, J., Leal, H. F., Queiroz, A. T. L. D., Da Silva Filho, H. P., & Reis, J. N. (2020). Bacterial diversity and prevalence of antibiotic resistance genes in the oral microbiome. *PLOS ONE*, 15(9), 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239664>
- Alves, C. H., Russi, K. L., Rocha, N. C., Bastos, F., Darrieux, M., Parisotto, T. M., & Girardello, R. (2022). Host-microbiome interactions regarding peri-implantitis and dental implant loss. *Journal of Translational Medicine*, 20(425), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12967-022-03636-9>
- Apaza-Bedoya, K., Tarce, M., Benfatti, C. A. M., Henriques, B., Mathew, M. T., Teughels, W., & Souza, J. C. M. (2017). Synergistic interactions between

- corrosion and wear at titanium-based dental implant connections: A scoping review. *Journal of Periodontal Research*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/jre.12469>
- Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2018). Peri-implant health. *Journal of Periodontology*, 89(1), S249–S256. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0424>
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397–409. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0019-y>
- Assunção, M. A., Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Matos, A. P. A., Mendes, J. J., Bessa, L. J., Taveira, N., & Santos, A. (2023). Dental Implant Surface Decontamination and Surface Change of an Electrolytic Method versus Mechanical Approaches: A Pilot In Vitro Study. *Journal of Clinical Medicine*, 12(1730), 1–10. <https://doi.org/10.3390/jcm12041703>
- Barroso, H., Ramalhete, R., Domingues, A., & Maci, S. (2018). Inhibitory activity of a green and black tea blend on *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Microbiology*, 10(1), 1–5. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1481322>
- Becker, S. T., Beck-Broichsitter, B. E., Graetz, C., Dörfer, C. E., Wiltfang, J., & Häslér, R. (2014). Peri-Implantitis versus Periodontitis: Functional Differences Indicated by Transcriptome Profiling: The Peri-Implantitis Transcriptome. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(3), 401–411. <https://doi.org/10.1111/cid.12001>

- Belibasakis, G. N. (2014). Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archives of Oral Biology*, 59(1), 66–72.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.013>
- Belibasakis, G. N., Charalampakis, G., Bostanci, N., & Stadlinger, B. (2015). Peri-Implant Infections of Oral Biofilm Etiology. Em G. Donelli (Ed.), *Biofilm-based Healthcare-associated Infections* (Vol. 830, pp. 69–84). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-7_4
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K.-T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, S313–S318.
<https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>

- Bessa, L. J., Botelho, J., Machado, V., Alves, R., & Mendes, J. J. (2022). Managing Oral Health in the Context of Antimicrobial Resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(16448), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/ijerph192416448>
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., & Koo, H. (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>
- Brookes, Z. L. S., Belfield, L. A., Ashworth, A., Casas-Agustench, P., Raja, M., Pollard, A. J., & Bescos, R. (2021). Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Journal of Dentistry*, 113, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103768>
- Buonavoglia, A., Leone, P., Solimando, A. G., Fasano, R., Malerba, E., Prete, M., Corrente, M., Prati, C., Vacca, A., & Racanelli, V. (2021). Antibiotics or No Antibiotics, That Is the Question: An Update on Efficient and Effective Use of Antibiotics in Dental Practice. *Antibiotics*, 10(5), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10050550>
- Busscher, H. J., Rinastiti, M., Siswomihardjo, W., & Van Der Mei, H. C. (2010). Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *Journal of Dental Research*, 89(7), 657–665. <https://doi.org/10.1177/0022034510368644>
- Carcuac, O., Derks, J., Charalampakis, G., Abrahassom, I., Wennström, J., & Berglundh, T. (2015). *Adjunctive Systemic and Local Antimicrobial Therapy in*

the Surgical Treatment of Peri-implantitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. 95(1), 50–57. <https://doi.org/10.1177/0022034515601961>

Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (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, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

Chaparro, A., Beltrán, V., Betancur, D., Sam, Y.-H., Moaven, H., Tarjomani, A., Donos, N., & Sousa, V. (2022). Molecular Biomarkers in Peri-Implant Health and Disease: A Cross-Sectional Pilot Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 1–8. <https://doi.org/10.3390/ijms23179802>

Charalampakis, G., & Belibasakis, G. N. (2015). Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*, 6(3), 183–187. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.980661>

Costa, R. C., Abdo, V. L., Mendes, P. H. C., Mota-Veloso, I., Bertolini, M., Mathew, M. T., Barão, V. A. R., & Souza, J. G. S. (2021). Microbial Corrosion in Titanium-Based Dental Implants: How Tiny Bacteria Can Create a Big Problem? *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*, 7(4), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s40735-021-00575-8>

Dabdoub, S. M., Tsigarida, A. A., & Kumar, P. S. (2013). Patient-specific Analysis of Periodontal and Peri-implant Microbiomes. *Journal of Dental Research*, 92(12), 168S-175S. <https://doi.org/10.1177/0022034513504950>

De Avila, E., De Molon, R., Vergani, C., De Assis Mollo, Jr., F., & Salih, V. (2014). The Relationship between Biofilm and Physical-Chemical Properties of Implant Abutment Materials for Successful Dental Implants. *Materials*, 7(5), 3651–3662. <https://doi.org/10.3390/ma7053651>

De Oliveira, P. G. F. P., Bonfante, E. A., Bergamo, E. T. P., De Souza, S. L. S., Riella, L., Torroni, A., Benalcazar Jalkh, E. B., Witek, L., Lopez, C. D., Zambuzzi, W. F., & Coelho, P. G. (2020). Obesity/Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus on Peri-implantitis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(8), 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.05.005>

Deo, P., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 122–128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18

Dreyer, H., Grischke, J., Tiede, C., Eberhard, J., Schweitzer, A., Toikkanen, S. E., Glöckner, S., Krause, G., & 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>

- Eren, A. M., Borisy, G. G., Huse, S. M., & Mark Welch, J. L. (2014). Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(28), 2875–2884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409644111>
- Figuero, E., Graziani, F., Sanz, I., Herrera, D., & Sanz, M. (2014). Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontology 2000*, *66*(1), 255–273. <https://doi.org/10.1111/prd.12049>
- Frédéric, L., Michel, B., & Selen, 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>
- Ganesan, S. M., Dabdoub, S. M., Nagaraja, H. N., Mariotti, A. J., Ludden, C. W., & Kumar, P. S. (2022). Biome-microbiome interactions in peri-implantitis: A pilot investigation. *Journal of Periodontology*, *93*(6), 814–823. <https://doi.org/10.1002/jper.21-0423>
- Garaicoa-Pazmino, C., Sinjab, K., & Wang, H.-L. (2019). Current Protocols for the Treatment of Peri-implantitis. *Current Oral Health Reports*, *6*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1007/s40496-019-00227-4>
- Ghensi, P., Manghi, P., Zolfo, M., Armanini, F., Pasolli, E., Bolzan, M., Bertelle, A., Dell'Acqua, F., Dellasega, E., Waldner, R., Tessarolo, F., Tomasi, C., & Segata, N. (2020). Strong oral plaque microbiome signatures for dental implant diseases identified by strain-resolution metagenomics. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00155-7>

- Guo, X., Zhang, X., Qin, Y., Liu, H., & Wang, X. (2023). Endocarditis due to *Aggregatibacter* Segnis: A rare case report. *BMC Infectious Diseases*, 23(309), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08231-x>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Heitz-Mayfield, L., & Mombelli, A. (2014). The Therapy of Peri-implantitis: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 29, 325–345. <https://doi.org/10.11607/jomi.2014suppl.g5.3>
- Heuer, W., Kettenring, A., Stumpp, S. N., Eberhard, J., Gellermann, E., Winkel, A., & Stiesch, M. (2012). Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clinical Oral Investigations*, 16(3), 843–850. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0561-8>
- Huang, Y., Zhao, X., Cui, L., & Huang, S. (2021). Metagenomic and Metatranscriptomic Insight Into Oral Biofilms in Periodontitis and Related Systemic Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 12(728585), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.728585>
- Kang, Y., Sun, B., Chen, Y., Lou, Y., Zheng, M., & Li, Z. (2021). Dental Plaque Microbial Resistomes of Periodontal Health and Disease and Their Changes after Scaling and Root Planing Therapy. *mSphere*, 6(4), e00162-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00162-21>

- Kensara, A., Hefni, E., Williams, M. A., Saito, H., Mongodin, E., & Masri, R. (2021). Microbiological Profile and Human Immune Response Associated with Peri-Implantitis: A Systematic Review. *Journal of Prosthodontics*, 30(3), 210–234. <https://doi.org/10.1111/jopr.13270>
- Kensara, A., Saito, H., Mongodin, E. F., & Masri, R. (2023). Microbiological profile of peri-implantitis: Analyses of microbiome within dental implants. *Journal of Prosthodontics*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jopr.13653>
- Khoury, F., Keeve, P. L., Ramanauskaite, A., Schwarz, F., Koo, K.-T., Sculean, A., & Romanos, G. (2019). Surgical treatment of peri-implantitis – Consensus report of working group 4. *International Dental Journal*, 69, 18–22. <https://doi.org/10.1111/idj.12505>
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kim, H.-J., Ahn, D.-H., Yu, Y., Han, H., Kim, S. Y., Joo, J.-Y., Chung, J., Na, H. S., & Lee, J.-Y. (2023). Microbial profiling of peri-implantitis compared to the periodontal microbiota in health and disease using 16S rRNA sequencing. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 53(1), 69–84. <https://doi.org/10.5051/jpis.2202080104>

- Komatsu, K., Shiba, T., Takeuchi, Y., Watanabe, T., Koyanagi, T., Nemoto, T., Shimogishi, M., Shibasaki, M., Katagiri, S., Kasugai, S., & Iwata, T. (2020). Discriminating Microbial Community Structure Between Peri-Implantitis and Periodontitis With Integrated Metagenomic, Metatranscriptomic, and Network Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(596490), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596490>
- Kormas, I., Pedercini, C., Pedercini, A., Raptopoulos, M., Alassy, H., & Wolff, L. F. (2020). Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Antibiotics*, 9(11), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110835>
- Kotsakis, G. A., & Olmedo, D. G. (2021). Peri-implantitis is not periodontitis: Scientific discoveries shed light on microbiome-biomaterial interactions that may determine disease phenotype. *Periodontology 2000*, 86(1), 231–240. <https://doi.org/10.1111/prd.12372>
- Kubasiewicz-Ross, P., Fleischer, M., Piłula, A., Hadzik, J., Nawrot-Hadzik, I., Bortkiewicz, O., Dominiak, M., & Jurchyszyn, K. (2020). Evaluation of the three methods of bacterial decontamination on implants with three different surfaces. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 29(2), 177–182. <https://doi.org/10.17219/acem/112606>
- Kumar, P. S. (2013). Sex and the subgingival microbiome: Do female sex steroids affect periodontal bacteria?: *Sex steroids and subgingival bacteria*. *Periodontology 2000*, 61(1), 103–124. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00398.x>

- 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>
- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>
- Louropoulou, A., Slot, D. E., & Van Der Weijden, F. A. (2012). Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: A systematic review: Effect of mechanical means on implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 23(6), 643–658. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02208.x>
- Mameno, T., Wada, M., Onodera, Y., Fujita, D., Sato, H., & Ikebe, K. (2019). Longitudinal study on risk indicators for peri-implantitis using survival-time analysis. *Journal of Prosthodontic Research*, 63(2), 216–220.
<https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.12.002>
- Marotz, C., Zuniga, C., Zaramela, L., Knight, R., & Zengler, K. (2021). Host DNA Depletion in Saliva Samples for Improved Shotgun Metagenomics. In G. R. Adami (Ed.), *The Oral Microbiome* (pp. 87–92). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1518-8_6
- Monje, A., Catena, A., & Borgnakke, W. S. (2017). Association between diabetes mellitus/hyperglycaemia and peri-implant diseases: Systematic review and meta-

analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(6), 636–648.

<https://doi.org/10.1111/jcpe.12724>

Moraschini, V., Poubel, L. A. D. C., Ferreira, V. F., & Barboza, E. D. S. P. (2015).

Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 44(3), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.10.023>

Nguyen-Hieu, T., Borghetti, A., & Aboudharam, G. (2012). Peri-implantitis: From diagnosis to therapeutics: Peri-implantitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 3(2), 79–94. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00116.x>

Nørskov-Lauritsen, N. (2014). Classification, Identification, and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 214–240. <https://doi.org/10.1128/CMR.00103-13>

Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M., & Göker, M. (2018). Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(2007), 1–119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>

Oberoi, S. S., Dhingra, C., Sharma, G., & Sardana, D. (2015). Antibiotics in dental practice: How justified are we. *International Dental Journal*, 65(1), 4–10. <https://doi.org/10.1111/idj.12146>

- Paraizo, M., Botelho, J., Machado, V., Mendes, J. J., Alves, R., Mascarenhas, P., & Cardoso, J. M. (2020). Dental Implant Failure Rate and Marginal Bone Loss in Transplanted Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplantology*, 1(2), 85–96. <https://doi.org/10.3390/transplantology1020008>
- Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., DuLong, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*, 176(3), 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.001>
- Polizzi, A., Donzella, M., Nicolosi, G., Santonocito, S., Pesce, P., & Isola, G. (2022). Drugs for the Quorum Sensing Inhibition of Oral Biofilm: New Frontiers and Insights in the Treatment of Periodontitis. *Pharmaceutics*, 14(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122740>
- Preethanath, R. S., AlNahas, N. W., Bin Huraib, S. M., Al-Balbeesi, H. O., Almalik, N. K., Dalati, M. H. N., & Divakar, D. D. (2017). Microbiome of dental implants and its clinical aspect. *Microbial Pathogenesis*, 106, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.009>
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>

- Renvert, S., Hirooka, H., Polyzois, I., Kelekis-Cholakis, A., & Wang, H.-L. (2019). Diagnosis and non-surgical treatment of peri-implant diseases and maintenance care of patients with dental implants – Consensus report of working group 3. *International Dental Journal*, 69, 12–17. <https://doi.org/10.1111/idj.12490>
- Renvert, S., Persson, G. R., Pirih, F. Q., & Camargo, P. M. (2018). Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations: Diagnostic criteria of peri-implant health and diseases. *Journal of Periodontology*, 89, S304–S312. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0588>
- Renvert, S., & Quirynen, M. (2015). Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 15–44. <https://doi.org/10.1111/clr.12636>
- Rosenbaum, J., Usyk, M., Chen, Z., Zolnik, C. P., Jones, H. E., Waldron, L., Dowd, J. B., Thorpe, L. E., & Burk, R. D. (2019). Evaluation of Oral Cavity DNA Extraction Methods on Bacterial and Fungal Microbiota. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38049-6>
- Saadaoui, M., Singh, P., & Al Khodor, S. (2021). Oral microbiome and pregnancy: A bidirectional relationship. *Journal of Reproductive Immunology*, 145(103293), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103293>
- Sampatanukul, T., Serichetaphongse, P., & Pimkhaokham, A. (2018). Histological evaluations and inflammatory responses of different dental implant abutment

- materials: A human histology pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 20(2), 160–169. <https://doi.org/10.1111/cid.12562>
- Sanz-Martin, I., Doolittle-Hall, J., Teles, R. P., Patel, M., Belibasakis, G. N., Hämmerle, C. H. F., Jung, R. E., & Teles, F. R. F. (2017). Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina sequencing. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(12), 1274–1284. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12788>
- Sarmiento, H. L., Norton, M., Korostoff, J., Ko, K. I., & Fiorellini, J. P. (2018). Surgical Alternatives for Treating Peri-implantitis. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 38(5), 665–671. <https://doi.org/10.11607/prd.3639>
- Schwarz, F., Alcoforado, G., Guerrero, A., Jönsson, D., Klinge, B., Lang, N., Mattheos, N., Mertens, B., Pitta, J., Ramanauskaite, A., Sayardoust, S., Sanz-Martin, I., Stavropoulos, A., & Heitz-Mayfield, L. (2021). Peri-implantitis: Summary and consensus statements of group 3. The 6th EAO Consensus Conference 2021. *Clinical Oral Implants Research*, 32(21), 245–253. <https://doi.org/10.1111/clr.13827>
- Sirinirund, B., Garaicoa-Pazmino, C., & Wang, H.-L. (2019). Effects of Mechanical Instrumentation with Commercially Available Instruments Used in Supportive Peri-implant Therapy: An In Vitro Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 34(6), 1370–1378. <https://doi.org/10.11607/jomi.7409>

- Son, M., Song, Y., Yu, Y., Kim, S. Y., Huh, J.-B., Bae, E.-B., Cho, W.-T., Na, H. S., & Chung, J. (2023). The oral microbiome of implant-abutment screw holes compared with the peri-implant sulcus and natural supragingival plaque in healthy individuals. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 53(3), 233–244. <https://doi.org/10.5051/jpis.2300100005>
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1027–1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Souza, J. G. S., Bertolini, M. M., Costa, R. C., Nagay, B. E., Dongari-Bagtzoglou, A., & Barão, V. A. R. (2021). Targeting implant-associated infections: Titanium surface loaded with antimicrobial. *iScience*, 24(1), 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.102008>
- Staubli, N., Walter, C., Schmidt, J. C., Weiger, R., & Zitzmann, N. U. (2017). Excess cement and the risk of peri-implant disease—A systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 28(10), 1278–1290. <https://doi.org/10.1111/clr.12954>
- Sukumar, S., Roberts, A. P., Martin, F. E., & Adler, C. J. (2016). Metagenomic Insights into Transferable Antibiotic Resistance in Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, 95(9), 969–976. <https://doi.org/10.1177/0022034516648944>
- Tramice, A., Paris, D., Manca, A., Guevara Agudelo, F. A., Petrosino, S., Siracusa, L., Carbone, M., Melck, D., Raymond, F., & Piscitelli, F. (2022). Analysis of the oral microbiome during hormonal cycle and its alterations in menopausal

- women: The “AMICA” project. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-26528-w>
- Tsigarida, A. A., Dabdoub, S. M., Nagaraja, H. N., & Kumar, P. S. (2015). The Influence of Smoking on the Peri-Implant Microbiome. *Journal of Dental Research*, 94(9), 1202–1217. <https://doi.org/10.1177/0022034515590581>
- Vela, X., & Rodríguez, X. (2019). The State of the Art of the Implant-Abutment Design to Maximize the Peri-Implant Tissue Potential. Em T. R. Schoenbaum (Ed.), *Implants in the Aesthetic Zone* (pp. 317–334). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-72601-4_16
- Verdugo, F., Laksmanna, T., & Uribarri, A. (2016). Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis. *Archives of Oral Biology*, 64, 39–50.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.12.007>
- Wang, C.-W., Renvert, S., & Wang, H.-L. (2019). Nonsurgical Treatment of Periimplantitis. *Implant Dentistry*, 28(2), 155–160.
<https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000846>
- Wang, W. C., Lagoudis, M., Yeh, C.-W., & Paranhos, K. S. (2017). Management of peri-implantitis – A contemporary synopsis. *Singapore Dental Journal*, 38, 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.sdj.2017.10.001>
- Yamane, K., Ayukawa, Y., Takeshita, T., Furuhashi, A., Yamashita, Y., & Koyano, K. (2013). Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials.

Clinical Oral Implants Research, 24(12), 1310–1315.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02574.x>

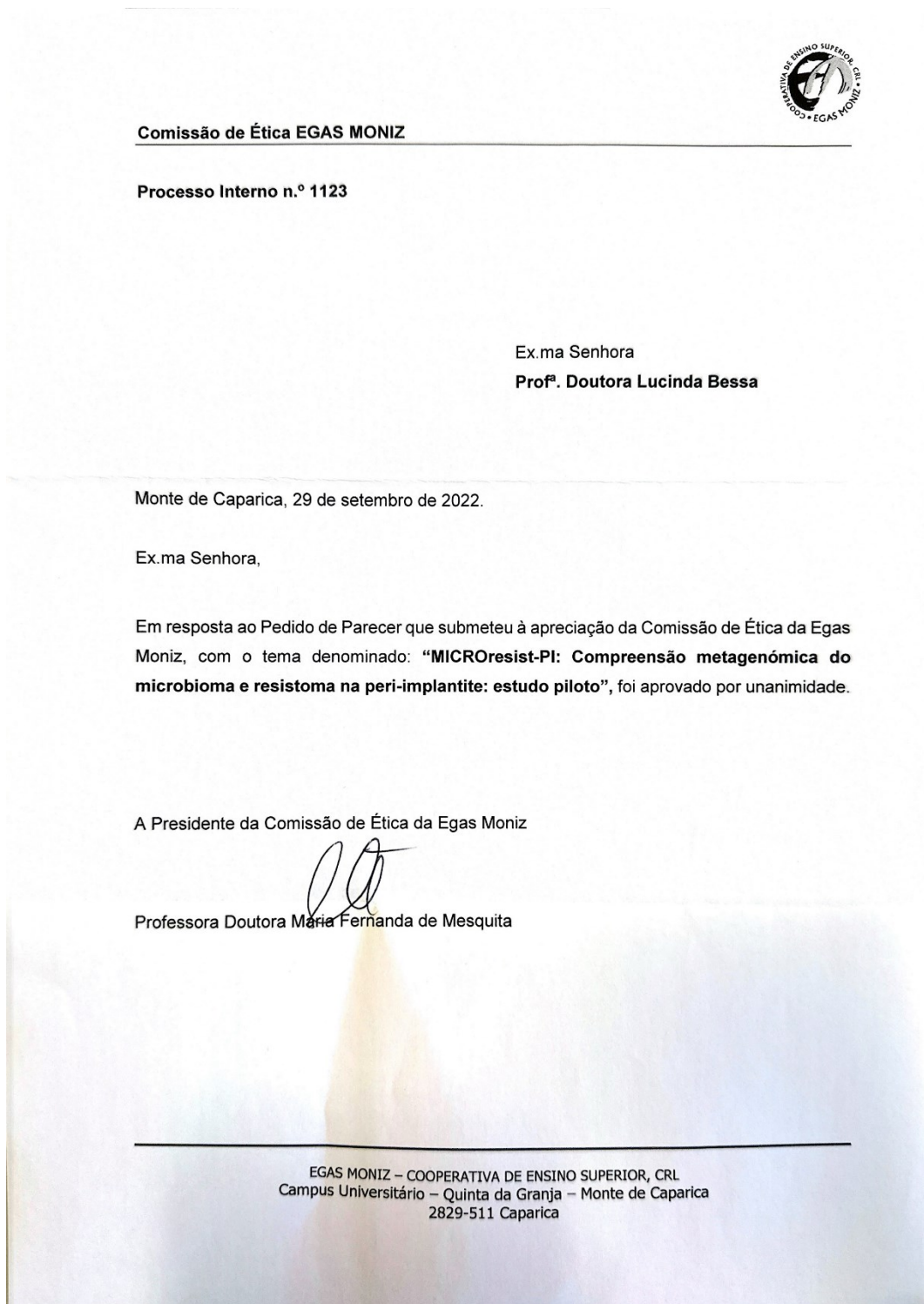
Yang, S.-M., Park, J.-B., & Ko, Y. (2015). Use of Confocal Microscopy for Quantification of Plastic Remnants on Rough Titanium After Instrumentation and Evaluation of Efficacy of Removal. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 30(3), 519–525. <https://doi.org/10.11607/jomi.3500>

Yu, X., Chan, Y., Zhuang, L., Lai, H., Lang, N. P., Keung Leung, W., & Watt, R. M. (2019). Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. *Clinical Oral Implants Research*, 30(8), 760–776. <https://doi.org/10.1111/clr.13459>

Zheng, H., Xu, L., Wang, Z., Li, L., Zhang, J., Zhang, Q., Chen, T., Lin, J., & Chen, F. (2015). Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Scientific Reports*, 5(10948), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10948>

6 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação concedida pela Comissão de Ética Egas Moniz.



Anexo 2 – Consentimento informado.



Consentimento Informado

Código | IMP-EM-PE-17_03

Monte de Caparica, ____ de _____ de 2023

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito de um projeto de investigação a decorrer na Egas Moniz – Cooperativa de Ensino Superior, CRL, e cuja Investigadora Responsável é a Prof.^a Doutora Lucinda Bessa, solicita-se autorização para a participação no estudo "MICROresist-PI: Compreensão metagenómica do microbioma e resistoma na peri-implantite: estudo-piloto", a pacientes com implantes dentários, com o objetivo de lhes fazer um breve questionário, recolher amostras de saliva e amostras da flora microbiana junto ao implante, que consiste na seguinte participação:

- Responder a um breve questionário (menos de 5 min): sexo, idade; história clínica (patologias sistémicas e toma de medicamentos); hábitos tabágicos ou consumo de álcool;
- Antecipadamente a uma consulta previamente agendada, terá de haver a confirmação de que o paciente não tomou antibióticos ou antifúngicos nos 2 meses que antecedem a consulta, e será pedido a cada paciente que 1) não comam ou bebam nas 2 h anteriores à consulta, e que 2) não lavem os dentes nem usem qualquer solução para bochechar nas 24 h que antecedem a mesma consulta;
- No início da consulta, será pedido ao paciente que ceda cerca de 2 mL da sua saliva (salivando para um tubo) e ser-lhe-á colhida uma pequena amostra com uma tirinha de papel da zona adjacente ao implante, com desconforto mínimo.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo. A recolha das amostras não é invasiva.

Este estudo pode trazer benefícios tais como obter novo conhecimento sobre a comunidade de microrganismos presente à volta do implante saudável ou com peri-implantite (implantes com inflamação e perda óssea) o que ajudará a desvendar melhor métodos de prevenção e tratamento da peri-implantite.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelos investigadores da equipa do projeto. A sua recolha é anónima e confidencial. As amostras colhidas serão destruídas após o final do estudo.

(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)

Anexo 3 – Questionário para a seleção dos participantes na amostra.



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

Questionário

Código paciente _____

Data ____/____/____

Idade

Preencha com uma cruz (X) ou com a informação pedida.

Género

Gravidez

Amamentação

Apresenta alguma doença imune, inflamatória ou que leve a uma perda intensa de peso?

(Doenças genéticas, Doenças que afetem a mucosa oral e o tecido gengival, Doenças que afetem o tecido conjuntivo, Doenças endócrinas e metabólicas, Infecção por HIV, Diabetes mellitus, Artrite, Aterosclerose, Cancro, Hipertiroidismo, Depressão, Doença do trato gastrointestinal, Síndrome de má absorção etc.)

Se sim qual? _____

História de Hepatite?

Se sim qual? _____

Toma medicação?

Se sim, qual? _____

Tomou antibióticos e/ou antifúngicos há menos de 2 meses?

Sim

Não

Se sim, sabe qual o nome? _____

Hábitos Tabágicos

Sim

Não

Média de cigarros por dia

Ex-fumador

Sim

Não

Aparatologia ortodôntica

Sim

Não

Número de dentes remanescentes _____

Número de implantes dentários _____ a) saudáveis _____ b) com PI _____

Posição implante saudável para recolha de amostra _____

Posição implante com PI diagnosticada para recolha da amostra _____

OPTIMISATION OF SUBGINGIVAL BIOFILM SAMPLING AND DNA EXTRACTION PROTOCOL FOR SHOTGUN METAGENOMIC SEQUENCING

Carolina Pires¹, Ricardo Alves^{1,2,3}, João Botelho^{1,2,3,4}, Helena Barros^{1,2}, Vanessa Machado^{1,2,3,4}, Gil Alcoforado^{1,2,3}, José J. Mendes^{1,2,3,4}, Lucinda J. Bessa^{1,2}

¹Instituto Universitário Egas Moniz (IUTM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

²Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiEM) Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

³Clinical Research Unit (CRU), CiEM, Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

⁴Evidence-based Hub, CiEM, Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

 **EGAS MONIZ SCHOOL OF HEALTH & SCIENCE**  **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

 **EGAS MONIZ CENTER FOR INTERDISCIPLINARY RESEARCH**

Peri-implantitis (PI) is an immune-mediated biofilm pathological condition and is considered the leading peri-implant disease (Wang et al., 2017). It is characterized by inflammation of the peri-implant connective tissue, with clinical signs of inflammation, bleeding and/or suppuration on probing, increased probing depth and progressive loss of supporting bone that can lead to implant loss (Berglundh et al., 2018; Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2018). More in-depth studies, such as those using shotgun metagenomics sequencing, are essential to unveil the microbial and functional dysbiotic state in PI (Chensi et al., 2020).

The aim of this study: Optimise the protocol for collecting subgingival samples from dental implants (both healthy or diagnosed with PI), for further DNA extraction and subsequent shotgun metagenomics sequencing analysis.

Subgingival biofilm samples – collection methods

Samples were collected from single implants using three different methods, namely:

- Four size 45 paper points (Figure 1)
- A curette plus a paper point (Figure 2)
- Three periopaper strips 0-1.2 μ L (Orflow) (Figure 3)



Figure 1
Paper points size 45 (a)



Figure 2
Curette and a paper point (h)



Figure 3
Periopapers (c)

- ✓ Before collecting the samples, the supragingival plaque was removed from the dental area above the gingiva with cotton rolls
- ✓ Then, the procedure for each method was as follows:
 - a) Each sterile paper point held with a sterile dental tweezer was inserted through the surface of the implant and into the gingival sulcus
 - b) A debridement was performed with the curette between the implant surface and the gingival sulcus, and then the paper cone was inserted
 - c) Each sterile dental periopaper held with a sterile dental tweezer was inserted through the surface of the implant and into the gingival sulcus
- ✓ All samples were placed in a Tris-EDTA buffer solution, stored at -80°C

DNA extraction was performed from all samples using the **DNeasy PowerSoil Pro Kit** (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, but a prior step was added to deplete human DNA, and it involved osmotic lysis in water followed by the addition of propidium monoazide (PMA) to allow selective degradation of host cell DNA.

- Overall, the paper point method (a) produced results that were more variable and was found to be less effective (DNA concentrations below 10 ng/μL)
- The use of a curette (b) required prior anaesthesia with local anaesthetics, such as lidocaine or articaine, and did not provide a significant increase in extracted DNA concentration
- Thus, the method considered most appropriate for collecting a larger amount of sample and resulting in a sufficient amount of DNA was the one that used three preclipapers per implant (c) (yielding DNA concentrations higher than 20 ng/μL)
- As expected, regardless of the method, healthy implants were more challenging than PI-affected implants because they generally harbour a less abundant subgingival biofilm

This work was financially supported by Portuguese National Funds (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) through project 2022.01430.PTDC.

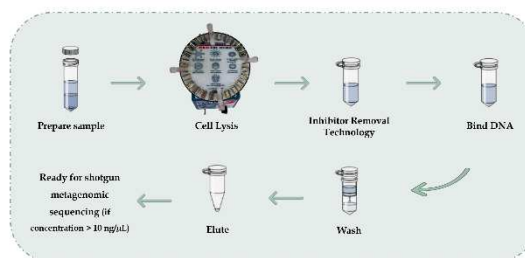
Human DNA depletion

- When ready for DNA extraction, the sample was thawed, centrifuged at 15,000 x g for 6 min at 4°C, and washed once with PBS 1x
- The cell pellet was resuspended in nuclease-free water and left at room temperature for 6 min to allow osmotic lysis of the human cells
- PMA (10 µM) was added and incubated at room temperature in the dark for 5 min, to allow intercalation with the human DNA (that is not protected by a cell membrane)
- Samples were placed horizontally on ice, < 15 cm from a light source with a wavelength of 488 nm, and exposed to light for 26 min, shaking and rotating every 5 min to ensure full light penetration (Figure 4) – by exposure to visible light, PMA forms a covalent bond with the DNA, breaking it into small fragments that will further be removed from downstream analysis
- After that, samples were ready for DNA extraction using the DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions



Figure 4
Exposure to light

DNeasy Power Soil Pro Kit



Sampling subgingival biofilms from dental implants can be challenging. This preliminary study was essential to optimise subgingival sampling of dental implants, as the various sampling protocols reported in the literature proved not to be equally suitable for our aim, which is to extract sufficient total microbial DNA from samples for subsequent shotgun metagenomic sequencing analysis.

In sum, the best collection method to serve our purpose was to collect the subgingival biofilm from each implant using three periopapers.

[illegible]

Anexo 5 – Poster submetido no 10th Congress of European Microbiologists (FEMS23).



Studying the microbiome and resistome in peri-implantitis

Carolina Pires¹, Ricardo Alves^{1,2,3}, João Botelho^{1,2,3,4}, Gil Alcoforado^{1,2,3}, José J. Mendes^{1,2,3,4}, **Lucinda J. Bessa^{1,2}**

lbessa@egasmoniz.edu.pt

¹Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal
²Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal
³Clinical Research Unit (CRU), CiEM, Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal
⁴Evidence-Based Hub, CiEM, Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal



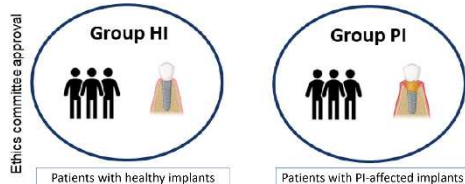
INTRODUCTION

Peri-implantitis (PI) is an immune-mediated biofilm pathological condition and is considered the leading peri-implant disease (Wang et al., 2017). It is characterized by inflammation of the peri-implant connective tissue, with clinical signs of inflammation, bleeding and/or suppuration on probing, increased probing depth and progressive loss of supporting bone that can lead to implant loss (Berglundh et al., 2018; Kormas et al., 2020; Renvert et al., 2018). **Understanding the microbiome in dental implants and its resistome in both health and disease states can provide valuable data to improve diagnostic and treatment strategies for PI.** Metagenomic sequencing techniques are required given the complex oral microbiome composition and structure.

MATERIALS AND METHODS

Recruitment of patients from Egas Moniz Dental Clinic

Pre-establishment of a set of inclusion and exclusion criteria. A questionnaire to gather relevant data and clinical information was applied.



Saliva samples – collection method

At least 1 mL of saliva was collected from each patient through an unstimulated method directly to a specific saliva collection tube.

Subgingival biofilm samples – collection methods (preliminary study)

Subgingival samples were collected from single implants using three different methods in a set of preliminary patients in order to optimize sample collection and choose the best method:

- Four size 45 paper points
- A curette plus a paper point
- Three periopaper strips 0- 1.2 µL (OralFlow)



Paper points size 45 (a)



Curette and a paper point (b)



Periopapers (c)

Microbial DNA extraction

Microbial DNA extraction was performed from all samples (saliva and subgingival biofilm) using the **DNeasy PowerSoil Pro Kit** (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, but a prior step was added to deplete human DNA, and it involved osmotic lysis in water followed by the addition of propidium monoazide (PMA) and exposure to a light source with a wavelength of 488 nm for 25 min, to allow selective degradation of host cell DNA (Marotz et al., 2021).

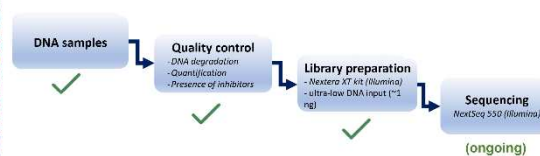
RESULTS

- Overall, the paper point method (a) produced results that were more variable and was found to be less effective (DNA concentrations below 10 ng/µL)
- The use of a curette (b) required prior anesthesia with local anesthetics, such as lidocaine or articaine, and did not provide a significant increase in extracted DNA concentration
- Thus, the method considered most appropriate for collecting a larger amount of subgingival sample and resulting in a sufficient amount of DNA was the one that used three periopapers (OralFlow) per implant (c) (yielding DNA concentrations higher than 20 ng/µL)
- A total of 40 DNA samples (10 of saliva + 10 of subgingival biofilm, for each group of patients) have been obtained so far, and are being analyzed through shotgun metagenomic sequencing

ONGOING WORK

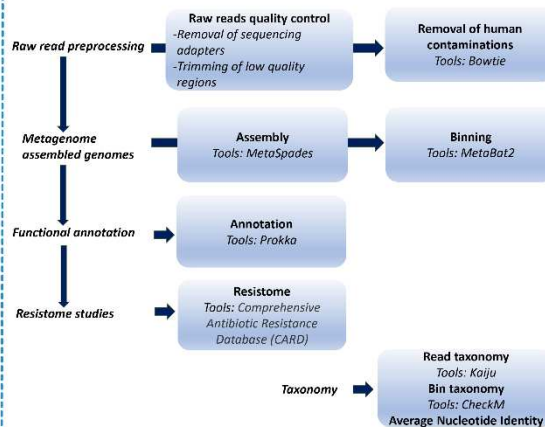
Shotgun metagenomic sequencing - workflow

- Library preparation and sequencing



Bioinformatics analysis

- Assembly, binning, and annotation



REFERENCES

- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila Orta, G., Blanco, J., Carrasco, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figueroa, E., Hammarstedt, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Horvati, B., Isidor, V., Kato, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... Zilberman, H. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, 5215-5238. <https://doi.org/10.1097/PER.0000000000000579>
- Kormas, I., Mouton, C., Pichon, A., Heflinger, M., Aussy, J., A. Vohl, L. P. (2020). Peri-implantitis: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological Characteristics, and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Archives*, 8(1), 1-18. <https://doi.org/10.23937/2373-1008>
- Mason, C., Zhang, C., Zaman, L., Knight, R., Knight, K. (2021). Host DNA Depletion in Saliva Samples for Improved Shotgun Metagenomics. In: *Advances in Oral Microbiology*. Methods in Molecular Biology, vol 2027. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1518-8_6
- Renvert, S., Persson, G. R., Pihls, T. O., & Carrasco, P. M. (2018). Peri-implant health, peri-implantitis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations: Diagnostic criteria of peri-implant health and disease. *Journal of Periodontology*, 89, 5239-5252. <https://doi.org/10.1097/PER.0000000000000580>
- Wang, W. C., Looijck, M., Van, C. W., & Pienhuijs, K. G. (2017). Management of peri-implantitis – A contemporary overview. *Singapore Dental Journal*, 38, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.sdg.2017.10.001>

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Portuguese National Funds (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) through project 2022.01430.PTDC.

