



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA PERI-IMPLANTAR E
DA PERI-IMPLANTITE: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho submetido por
André Reis Catarino Neiva da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA PERI-IMPLANTAR E
DA PERI-IMPLANTITE: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho submetido por
André Reis Catarino Neiva da Silva
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Nuno Taveira

setembro de 2021

Dedicatória

Dedico todo este trabalho bem como todo o meu percurso acadêmico à minha mãe e ao meu pai, pois foi graças a ambos, cada um da sua forma, que me permitiram e tornaram possível tirar um curso superior. Ao meu avô Hermínio Lopes Catarino por ter sido como um segundo pai e com poucas palavras me ter dado sempre os melhores conselhos.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Taveira por me ter estendido a mão quando me foi retirado o tapete no momento em que fiquei sem tese e orientador, pela sua excelente orientação, dedicação e total disponibilidade para com o meu trabalho.

À cooperativa Egas Moniz por todos estes anos que me acolheu como um membro desta grande família, de onde saio não só com um curso superior, mas também com muitos ensinamentos que irei levar para a vida lá fora. Pelo apoio e prontidão em solucionar todos os problemas que foram aparecendo no caminho.

Aos meus pais por todo o apoio e por tornarem tudo isto possível, pela educação que me deram e por todos os dias me motivarem a ser cada vez mais e melhor. Em especial à minha mãe que diariamente teve que lidar com o mau humor de dias menos bons e me ter ensinado sempre a relativizar os problemas da vida pois só assim conseguia a clarividência para os solucionar da melhor forma.

Aos meus amigos de Ciências da Saúde, que embora poucos tenham ficado, são bons e para a vida, um grande obrigado por me terem acompanhado neste percurso, um especial agradecimento à Letícia Garcia, à Susana Paiva, ao João Pinto, à Joana Maximiano e Mariana Galhardo.

Aos meus colegas de curso, que tão bem me acolheram na minha mudança, de entre os quais encontro pessoas a quem posso chamar de amigos e que tenciono levar para fora, que me deram todo o apoio e amizade durante estes 5 anos, em especial à Inês Allen e à Carolina Fernandes.

Resumo

Introdução: A maior parte das infecções relacionadas com implantes dentários resulta da acumulação de placa bacteriana, podendo também estar relacionada com fatores do hospedeiro. Torna-se assim imperativo saber qual o microbioma desta placa bacteriana acumulada e de que forma é que varia consoante o estado dos tecidos circundantes. A melhor forma de caracterizar o microbioma das infecções relacionadas com implantes dentários é sequenciando o metagenoma microbiano ou os genes do 16S rRNA dos diferentes microrganismos com recurso às tecnologias ultraprofundas de sequenciação de nova geração. A utilização destas tecnologias na caracterização do microbioma das peri-implantites é relativamente recente.

Objetivos: Este trabalho tem como objetivo a caracterização do microbioma da superfície peri-implantar saudável e da peri-implantite em diferentes faixas etárias, geografias e etnias, tendo como base a informação obtida pela sequenciação do gene 16S rRNA através de técnicas de sequenciação de última geração. O melhor conhecimento do microbioma da peri-implantite, pode levar à melhor prevenção e tratamento desta doença.

Materiais e métodos: Pesquisa na base de dados do PubMed, de artigos publicados entre 2016 e 30 de Junho de 2021 com palavras-chave: ((Peri-implantitis) and (microbiome); (Oral Implant) and (microbiome); (Peri-implantitis) and (microbiome) and (NGS)).

Resultados: Foram obtidos 130 resultados, após a remoção dos duplicados, sendo 45 elegíveis para leitura integral. Após a leitura, restaram 21 artigos que cumpriam todos os critérios de inclusão e deles foi extraída toda a informação analisada nesta tese. A informação dos artigos nesta revisão foi resumida em tabelas, de forma a ser mais perceptível a sua exposição. Embora com algumas divergências, a maior parte dos estudos apontou para uma maior diversidade microbiana nas situações de doença peri-implantar em comparação com situações de saúde peri-implantar. Os géneros bacterianos mais abundantes em peri-implantite foram: *Tannerella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Prevotella*, *Capnocytophaga* e *Chloroflexi*. Em saúde peri-implantar, os géneros mais abundantes foram: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Synergistetes* e, por fim *Saccharibacteria*.

Conclusão: O microbioma da peri-implantite parece ser diferente do microbioma do peri-implante saudável, mas ainda não é possível saber ao certo a sua constituição total de referência devido às discrepâncias existentes na informação disponível.

Palavras-chave: Peri-implantite; Microbioma; Saúde peri-implantar; NGS;

Abstract

Introduction: The most part of infections related to dental implants are a result of plaque accumulation, as well as it can be related to host factors. So, it is imperative to unveil the constitution of this plaque and how it varies according to the state of the tissues. The best way to characterize the microbiome of the implant related infections is to sequence the microbial metagenome or the 16S rRNA genes from different microorganisms using new generation ultra-deep sequence technologies. The use of these technologies in characterizing the microbiome of peri-implantitis is recent.

Objectives: This essay has the objective to characterize the microbiome of the health surface of the implant and peri-implantitis one in different age groups, geographies and ethnicities using the 16S rRNA gene through Next-generation sequencing. The best knowledge of the microbiome of peri-implantitis can lead to a better prevention and treatment of this disease.

Materials and methods: A research for papers published from 2016 to June 30th 2021 through a data base called PubMed was made with the following keywords: ((Peri-implantitis) and (microbiome)); (Oral Implant) and (microbiome); (Peri-implantitis) and (microbiome) and (NGS)).

Results: 130 results were obtained, after removing the duplicates, from where 45 were eligible for full screening. After reading, the information from 21 papers, that fitted all the inclusion criteria, was extracted, and analyzed in this thesis. Several tables were made, so that all the papers information could be schematized. Although there were some discrepancies, most of the studies pointed for a bigger microbial diversity in peri-implantar diseases compared to healthy implantar states. The most abundant bacterial genera in peri-implantitis were: *Tannerella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Prevotella*, *Capnocytophaga* and *Chloroflexi*. In peri-implantar health, the most abundant genera were *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Veillonella*, *Synergistetes* and at last *Saccharibacteria*.

Conclusion: The microbiome of peri-implantitis seems different from the microbiome of the healthy implant, but it is not possible yet to know the reference constitution due to the existing discrepancies in the available information.

Keywords: Peri-implantitis; Microbiome; Peri-implantar health; NGS;

Índice

I.	Introdução.....	11
1.	Microbioma oral e os seus constituintes.....	11
2.	Saúde Peri-implantar	12
3.	Doença Peri-implantar e peri-implantite	13
4.	Sequenciação de última geração (Next-generation sequencing, NGS)	17
5.	Objetivos.....	24
II.	Materiais e métodos.....	25
1.	Fontes de informação.....	25
2.	Seleção de estudos	25
3.	Recolha de informação e síntese	26
III.	Resultados e Discussão.....	27
1.	Seleção dos estudos	27
2.	Análise descritiva	28
2.1.	Aspetos metodológicos.....	28
2.2.	Composição da microbiota	29
IV.	Conclusão	49
IV.	Bibliografia.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 - (A): Representação visual da profundidade de sondagem no estado de saúde peri-implantar, , onde é possível observar uma reduzida profundidade de sondagem e ausência de inflamação dos tecidos ao redor do implante bem como ausência de destruição óssea. (B): Representação visual da profundidade de sondagem no estado de Peri-implantite, onde é possível observar um aumento da profundidade de sondagem, bem como uma inflamação tecidular juntamente com perda óssea associada. Adaptado de: (Frédéric et al., 2018).	15
Figura 2 - Esquemática da não separação entre infiltrado inflamatório e o osso crestal, pela ausência de ligamento periodontal nos implantes. O ligamento periodontal, no caso de dentes naturais, estaria no local indicado a verde, impedindo o contato direto entre o infiltrado inflamatório e o osso da crista óssea. Adaptado de: (Berghlundh et al., 2019).16	
Figura 3 - Etapas de sequenciação do gene 16S rRNA através de técnicas de nova geração de alto rendimento. Esta sequenciação é constituída por recolha da amostra, extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA, processamento da informação através de ferramentas bioinformáticas e identificação dos microrganismos. Adaptado de: (Jo et al., 2016).	19
Figura 4 - Etapas da técnica de Pirosequenciação. Adaptado de: (Voelkerding et al., 2009).	20
Figura 5 - Etapas da tecnologia de sequenciação de última geração Illumina. Adaptado de: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf	21
Figura 6 - Comparação dos resultados que se podem obter utilizando sequenciação NGS dos genes 16S rRNA e de todos os genes de todos os microrganismos existentes numa amostra (metagenómica). Adaptado de: (Boers, Jansen, et al., 2019).	22
Figura 7 - Etapas da Metagenómica através de NGS. Adaptado de: (Simner et al., 2018).	23

Figura 8 - Diagrama de fluxo do PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis).....	27
Figura 9 - Diagrama de Venn do microbioma peri-implantar encontrado em saúde, na peri-implantite e em ambos os estados, nos diferentes estudos.....	42
Figura 10 - Prevalência de Filos bacterianos nos casos de saúde peri-implantar de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.....	42
Figura 11 - Prevalência de Géneros bacterianos nos casos de saúde peri-implantar de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.....	43
Figura 12 - Prevalência de Géneros bacterianos nos casos de peri-implantite de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.....	43

Índice de tabelas

Tabela 1 - Comparação entre a doença periodontal e a doença peri-implantar. Adaptado de: (Becker et al., 2014).....	16
Tabela 2 - Características microbiológicas relativas à Saúde peri-implantar em estudos Coorte	45
Tabela 3 - Características microbiológicas relativas à Saúde peri-implantar em Estudos clínicos e em estudos de Caso-controlo.....	46
Tabela 4 - Características microbiológicas relativas à Peri-implantite em estudos de Coorte.	47
Tabela 5 - Características microbiológicas relativas à Peri-implantite em Estudos clínicos e em estudos de Caso-controlo.	48

I. Introdução

Nos últimos 30 anos, o uso de implantes dentários para reabilitar dentes perdidos tem vindo a sofrer um aumento exponencial (Jenny et al., 2016). Nos dias de hoje, a taxa de sucesso dos implantes situa-se entre os 60-80% (Ferenc et al., 2019).

Atualmente, o conceito de sucesso implantar estende-se para lá da sobrevivência do implante. Para além da falta de mobilidade que o implante deverá apresentar, este conceito abrange também a manutenção da saúde dos tecidos em volta do mesmo, de forma a que estes não apresentem sinais inflamatórios (Daubert & Weinstein, 2019).

A infeção bacteriana na região implantar pode prejudicar o sucesso a longo prazo e a sobrevivência da reabilitação. A constituição da microbiota subgingival é crucial para determinar o sucesso/sobrevivência a longo prazo ou a falha do implantes dentários, mas pouca importância é ainda dada a este fator (Tamrakar et al., 2020).

1. Microbioma oral e os seus constituintes

Segundo Kommerein et al., (2018), o termo biofilme oral é definido como uma comunidade de microrganismos que aderem de forma irreversível aos dentes, epitélio da mucosa, língua, gengiva e espaço subgingival, bem como na superfície implantar, e que estão rodeados por uma matriz de polissacarídeos extra celulares.

A formação do biofilme em cada um destes locais é um processo que ocorre de forma complexa, coordenada e ordenada, envolvendo a formação de uma película adquirida e a sua colonização é realizada por colonizadores primários e em seguida por colonizadores secundários. No seu conjunto, estes microrganismos formam a microbiota oral que na maior parte dos estudos é representada pelo seu genoma, assumindo então a designação de microbioma oral (Shahi et al., 2020).

A cavidade oral humana agrega o segundo maior microbiota, logo a seguir ao trato gastrointestinal (Verma et al., 2018). Podem ser encontradas 772 espécies procariotas, das quais 70% podem ser cultivadas e 30% pertencem ao grupo de microrganismos não cultiváveis. A sequenciação do gene 16S rRNA da cavidade oral saudável categorizou as bactérias que nela habitam em 6 Filos diferentes: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes*, sendo que estas constituem cerca de 96% da microbiota oral (Verma et al., 2018).

É possível encontrar diversos tipos de tecidos, condições de crescimento e nutrientes na cavidade oral, permitindo assim diferentes microbiomas consoante a sua localização. As bolsas periodontais, por exemplo, permitem a formação de um habitat ideal ao crescimento de bactérias anaeróbias proteolíticas, sendo este um meio anaeróbio e rico em nutrientes (Frédéric et al., 2018).

A colonização bacteriana da superfície implantar começa nos 30 minutos seguintes à sua colocação em boca (Daubert & Weinstein, 2019).

Segundo, Berglundh et al., (2019), seguindo um padrão semelhante de colonização bacteriana ao dos dentes naturais, os colonizadores primários dos implantes são maioritariamente aeróbios e anaeróbios facultativos e cocos gram positivos. Dentro deste grupo de bactérias há algumas espécies específicas, como é o caso das *Streptococcus spp*, que são capazes de aderir às superfícies duras dos dentes, implantes ou coroas, sendo este considerado um colonizador primário, por esta razão. Um colonizador secundário é *Fusobacterium nucleatum*, que interage e comunica com outras bactérias e facilita a contínua formação de biofilme (Berglundh et al., 2019).

2. Saúde Peri-implantar

O estado de saúde peri-implantar partilha várias características clínicas com a saúde periodontal em volta de dentes saudáveis, embora seja clara a existência de diferenças estruturais entre os dois cenários, especialmente no tipo de contato com os tecidos adjacentes à peça dentária, seja esta natural ou um implante (Renvert et al., 2018).

Podemos classificar clinicamente e histologicamente a saúde peri-implantar. Clinicamente, a saúde peri-implantar caracteriza-se pela ausência de sinais de inflamação e hemorragia à sondagem. A saúde peri-implantar pode estar presente, tanto em implantes com nível ósseo normal como com nível ósseo reduzido (G. Caton et al., 2018). Numa mucosa em saúde peri-implantar, a resposta do hospedeiro inclui tanto eventos vasculares como celulares (Araujo & Lindhe, 2018).

Em saúde, a mucosa ao redor do implante forma uma relação estreita com o próprio implante, o pilar ou a coroa (Renvert et al., 2018). Histologicamente, encontramos tecido conjuntivo coberto por epitélio queratinizado ou não queratinizado (Araujo & Lindhe, 2018).

O tecido em volta do implante é formado em resultado do processo de cicatrização após a colocação do mesmo. O trauma causado aos tecidos após a osteotomia, durante a

colocação do implante, leva a uma série de reações no osso, incluindo a degradação do compartimento ósseo em que o implante é colocado. Os processos de modelação e remodelação óssea da interface com o implante podem demorar várias semanas e resultam na formação de novo osso que irá contactar com o implante diretamente, chamando-se este fenómeno Osteointegração. Este fenómeno inclui ainda a formação de epitélio juncional e uma adaptação do tecido conjuntivo em direção ao material implantar no espaço entre o epitélio e o osso (Berglundh et al., 2019).

3. Doença Peri-implantar e peri-implantite

Há cerca de 3 anos, a prevalência da doença peri-implantar situava-se, aproximadamente, nos 18.8% (Dreyer et al., 2018). Mais recentemente, em 2019, foi evidenciado que a prevalência dos casos de peri-implantite, após 6 a 7 anos da colocação do implante, está na ordem dos 4,7% e 3,6% (French et al., 2019).

Complicações biológicas associadas a implantes dentários são maioritariamente a inflamação dos tecidos e osso ao redor do implante e os seus restantes componentes, proveniente da acumulação de placa bacteriana (Renvert et al., 2018).

Apesar dos implantes apresentarem resultados previsíveis e caracterizarem um procedimento cirúrgico bastante utilizado na prática clínica diária, com o objetivo de reabilitar os espaços edêntulos, o desenvolvimento e progressão da peri-implantite prejudica gravemente o sucesso e a sobrevivência dos implantes (Corrêa et al., 2019).

A taxa de insucesso precoce dos implantes é de 10%, ocorrendo no primeiro ano após a colocação do implante, tem como causa principal a infeção bacteriana. Alguns exemplos de espécies bacterianas que estão na origem da inflamação tecidual e consequente perda óssea são: *Prevotella intermedium*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Damiati et al., 2018).

Atualmente, o modelo da etiologia da doença peri-implantar/doença periodontal, assenta no conceito de sinergia e disbiose polimicrobiana (Frédéric et al., 2018). Em pacientes com mais suscetibilidade, a disbiose espoleta uma resposta inflamatória do hospedeiro causando lesões nos tecidos em volta do implante e consequente perda óssea alveolar (Frédéric et al., 2018).

Não obstante, a qualidade do osso do leito implantar, as cargas oclusais, o biotipo gengival e os hábitos de higiene oral são também fatores que podem ser determinantes para a formação e progressão da peri-implantite (Schwarz et al., 2018).

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

A prevalência da periodontite, comparativamente com a peri-implantite, é mais estudada, sendo que os estudos sobre peri-implantite ainda estão numa fase inicial e apresentam valores com alguma divergência. Esta divergência deve-se às diferentes classificações utilizadas aquando da realização destes estudos (Frédéric et al., 2018).

Na observação clínica, a inflamação tecidual é detetada através da profundidade de sondagem com presença de hemorragia e a perda óssea através de radiografias (Schwarz et al., 2018).

O diagnóstico da peri-implantite requer a combinação de hemorragia à sondagem com perda óssea, sendo que esta última, posteriormente à cicatrização inicial, está entre valores de 0,5mm e 5mm. Durante os últimos 10 a 15 anos, acordou-se que durante o primeiro ano da colocação do implante em função, se a perda óssea ao redor do mesmo, após o período de cicatrização, for superior a 2mm, estamos perante um caso de peri-implantite (Renvert et al., 2018).

Uma vez que a doença implantar aparece nos primeiros anos da colocação do implante dentário em função, é de extrema importância a monitorização das mudanças que possam acontecer na sua fase de cicatrização, com especial foco à hemorragia à sondagem e evidência radiográfica de perda óssea peri-implantar (Renvert et al., 2018).

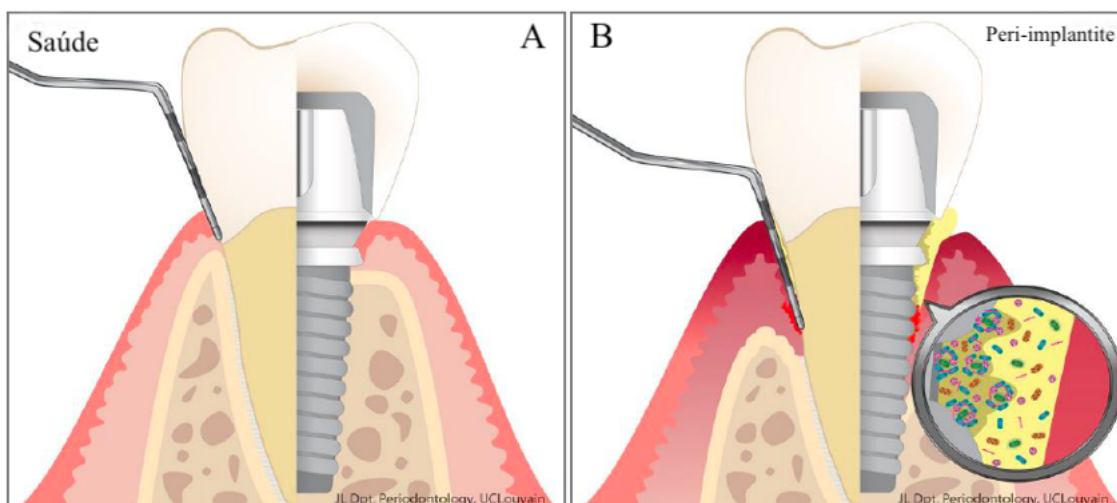


Figura 1 - (A): Representação visual da profundidade de sondagem no estado de saúde peri-implantar, onde é possível observar uma reduzida profundidade de sondagem e ausência de inflamação dos tecidos ao redor do implante bem como ausência de destruição óssea. **(B):** Representação visual da profundidade de sondagem no estado de Peri-implantite, onde é possível observar um aumento da profundidade de sondagem, bem como uma inflamação tecidual juntamente com perda óssea associada. Adaptado de: (Frédéric et al., 2018).

Enquanto há óbvias semelhanças clínicas entre a doença peri-implantar e a periodontite, há também claras diferenças entre ambas, nomeadamente no timing de iniciação e na sua progressão. Por norma, a peri-implantite tem início precoce, durante o primeiro ano de follow-up e uma progressão não linear de forma rápida comparativamente à periodontite (Berglundh et al., 2019).

No que toca às características clínicas, de acordo com Berglundh et al., (2019), a peri-implantite demonstra 3 grandes diferenças, comparativamente à periodontite. A primeira é a grande quantidade de placa que ocupa a bolsa periodontal em locais com doença peri-implantar enquanto o epitélio desse local não cobre toda a sua dimensão de mucosa (Figura 1B). A segunda é o facto de haver a falta de ligamento periodontal em volta dos implantes, e por isso, a inabilidade do tecido conjuntivo do implante em fazer a separação do infiltrado inflamatório do osso crestal, ou seja, contrariamente à periodontite, as lesões implantares estendem-se ao nível da crista óssea, como se pode observar na Figura 2. A terceira grande diferença é o tamanho e composição celular do infiltrado inflamatório.

Tabela 1 - Comparação entre a doença periodontal e a doença peri-implantar. Adaptado de: (Becker et al., 2014).

Periodontite	Peri-implantite
1. Destruição inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, incluindo ligamento periodontal e osso alveolar	1. Destruição inflamatória pela infecção dos tecidos moles em volta do implante e perda do osso circundante
2. Dentes naturais têm uma conexão epitelial através de hemidesmossomas e fibras de colagénio ancorados aos dentes	2. Implantes estão ancorados ao osso alveolar, em contato direto com o mesmo, sem qualquer tecido interposto
3. Progressão mais lenta	3. Progressão mais rápida devido à ausência do ligamento periodontal

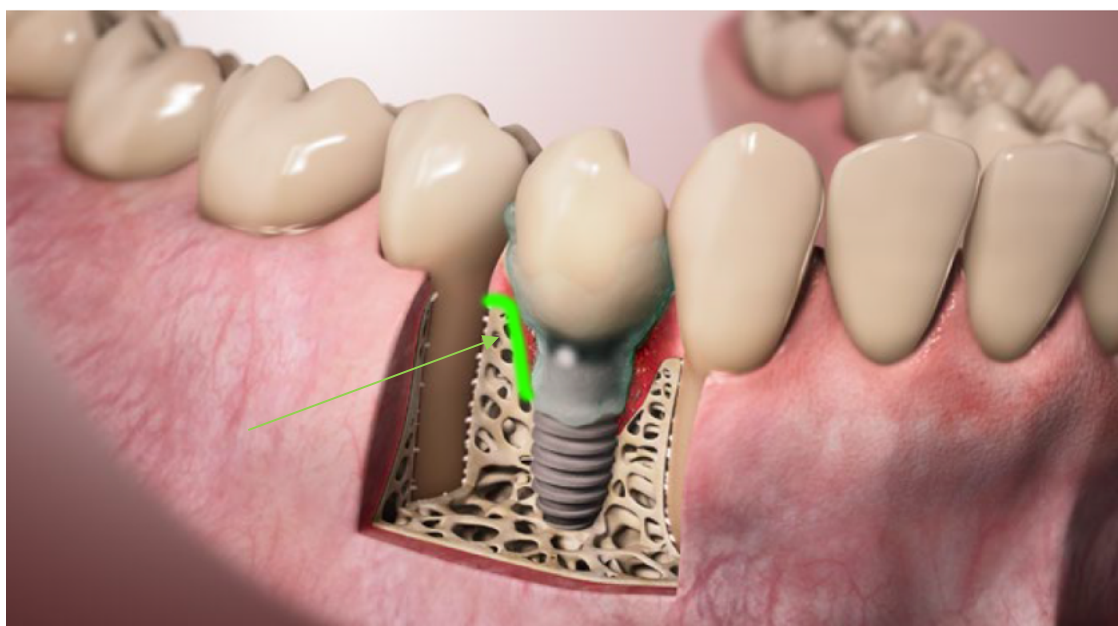


Figura 2 - Esquematização da não separação entre infiltrado inflamatório e o osso crestal, pela ausência de ligamento periodontal nos implantes. O ligamento periodontal, no caso de dentes naturais, estaria no local indicado a verde, impedindo o contato direto entre o infiltrado inflamatório e o osso da crista óssea. Adaptado de: (Berglundh et al., 2019).

A peri-implantite, segundo Berglundh et al., (2019), é considerada a complicação biológica, associada à reabilitação oral, mais desafiante, de tal forma que, se não tratada, pode progredir e resultar na perda do implante dentário. Adicionalmente, o tratamento da

peri-implantite exige bastantes recursos pelo que se torna fulcral a sua prevenção, de forma a minimizar a sua ocorrência e severidade.

Ainda de notar que alguns estudos sugerem que a presença de microrganismos periodontopatogénicos é necessária mas não suficiente para a iniciação da peri-implantite e, informação prévia aponta para que os mediadores ósseos inflamatórios produzidos pelo sistema imunitário do paciente tenham bastante impacto no rompimento e destruição dos tecidos em volta do implante (Corrêa et al., 2019).

Alguns fatores de risco associados ao paciente também devem ser tomados em conta quando se trata de perda óssea associada à peri-implantite, como é o caso de doenças autoimunes, pacientes fumadores e a toma de bifosfonatos (medicação para a Osteoporose) (French et al., 2019). A diabetes e a presença de periodontite são também conhecidos fatores de risco para a peri-implantite. (Dreyer et al., 2018).

Existem ainda outros fatores de risco, associados desta vez ao implante propriamente dito, que podem ser a sua localização alvo, o diâmetro do implante e o design do mesmo (French et al., 2019). Quanto à parte cirúrgica, esta também acarreta alguns fatores de risco relacionados com a perda óssea como é o caso da colocação de cargas imediatas nos implantes ou a presença de defeitos ósseos (French et al., 2019).

4. Sequenciação de última geração (Next-generation sequencing, NGS)

O conhecimento sobre o microbioma da saúde e da doença peri-implantar tem vindo a evoluir exponencialmente devido ao desenvolvimento das tecnologias de sequenciação dos microrganismos orais, permitindo identificar e quantificar os mesmos sem necessidade de cultura. Estas tecnologias podem aplicadas na sequenciação do gene 16S rRNA das bactérias e na sequenciação de todo o genoma bacteriano (metagenómica) (Boers et al., 2019).

Nos últimos anos tem vindo a aumentar a necessidade e o interesse em identificar a composição bacteriana nas diferentes partes do corpo. Um método fiável deverá ter características como alto rendimento e ser de fácil utilização, ser capaz de classificar o microbiota bacteriano com alta resolução e ser de baixo custo (Shahi et al., 2020).

Segundo Ilyas, (2018), o termo NGS refere-se a um grupo de tecnologias que têm em comum a capacidade de encontrar e capturar informação genética de milhões de reações sequenciais simultaneamente (Ilyas, 2018).

As técnicas NGS geram uma rápida resposta de sequenciação e fornecem uma extensa informação sobre os microrganismos presentes nos nichos em estudo (Verma et al., 2018). A informação daí obtida pode posteriormente dar origem à criação de biomarcadores com base em microrganismos, que possibilitam um diagnóstico precoce ou a associação imediata a certas patologias.

As tecnologias NGS possuem inúmeras vantagens comparativamente à sequenciação standard, sendo a principal a capacidade de sequenciar várias zonas alvo em simultâneo com apenas uma reação, contrariamente ao que acontece na sequenciação mais básica onde cada reação de sequenciação analisa apenas uma zona alvo. Em adição, visto que a sequenciação de cada molécula pode ser analisada individualmente, variantes alélicas de baixa frequência podem ser identificadas, em vez de perdidas no meio da informação principal (Ilyas, 2018).

A sequenciação dos genes que codificam para o 16S rRNA bacteriano envolve a amplificação através de PCR de uma região específica do gene 16S rRNA, seguida da preparação de uma biblioteca dos produtos amplificados, sequenciação dessa biblioteca e análise da informação sequencial (Figura 3).

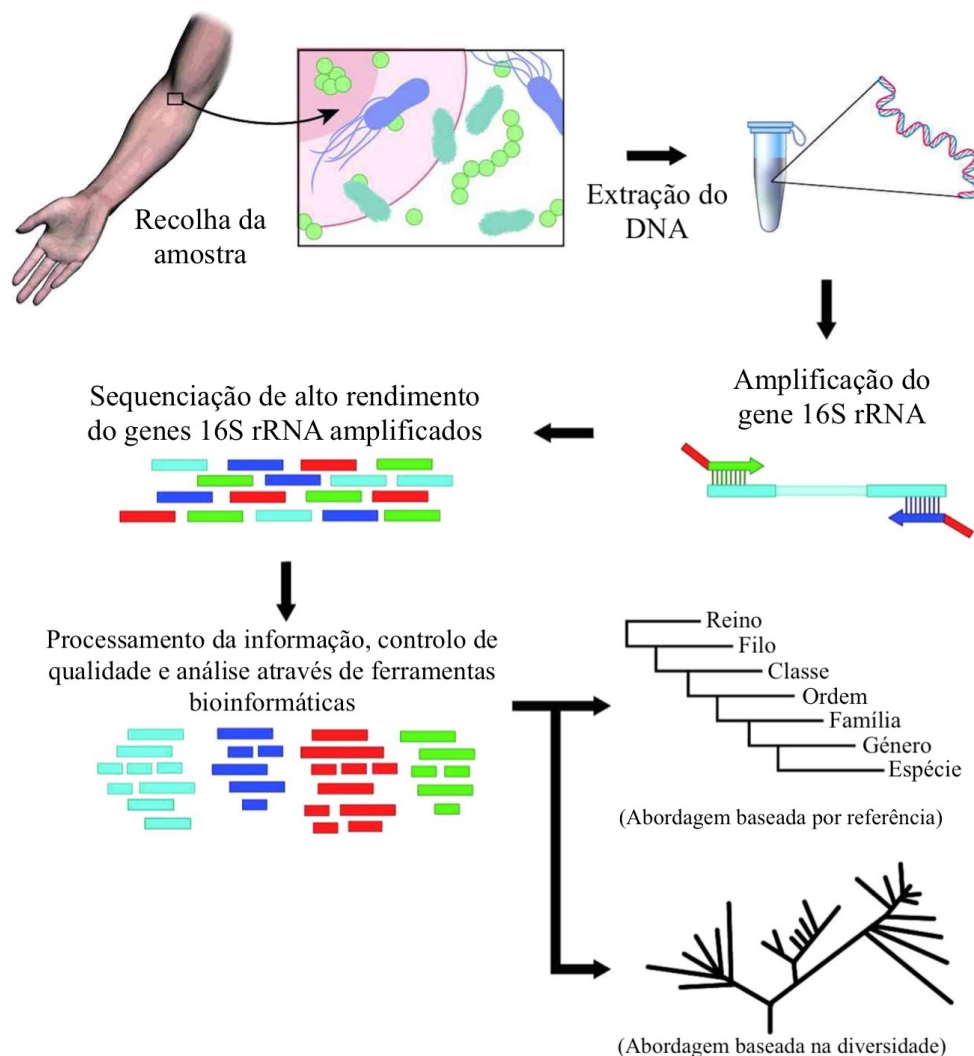


Figura 3 - Etapas de sequencição do gene 16S rRNA através de técnicas de nova geração de alto rendimento. Esta sequencição é constituída por recolha da amostra, extração do DNA, amplificação do gene 16S rRNA, processamento da informação através de ferramentas bioinformáticas e identificação dos microrganismos. Adaptado de: (Jo et al., 2016).

A sequencição 16S rRNA tem algumas limitações, sendo uma delas a reduzida resolução a nível taxonómico uma vez que os genes do 16S rRNA têm algumas semelhanças entre si e não permitem discriminar adequadamente as diferentes espécies bacterianas (Shahi et al., 2020).

A primeira técnica de sequencição de nova geração foi denominada de Pirosequencição (454 pyrosequencing), que funcionava através da deteção de pirofosfato, um subproduto proveniente da incorporação de nucleótidos, para identificar se uma base específica estava incorporada na cadeia de DNA em formação (Slatko et al., 2018). Fragmentos individuais de DNA, com 400-700 pb são ligados aos adaptadores e amplificados por PCR numa

solução construída especificamente composta por beads de cadeias de DNA complementares às sequências nos adaptadores, permitindo a ligação direta entre os fragmentos de DNA e os beads respectivos, idealmente um fragmento para cada bead. A síntese de DNA, e posterior detecção química da mesma, ocorrem numa câmara própria onde o pirofosfato libertado proveniente desta reação é detetado e medido, como pode ser observado na Figura 4. Ao encher as câmaras, consecutivamente, com reagentes de sequenciação contendo um dos quatro nucleótidos existentes, quando um destes é incorporado na cadeia sintetizada, a libertação de pirofosfato é medida utilizando uma reação luminosa (Slatko et al., 2018). Esta tecnologia é comumente utilizada para sequenciação genómica e amostras metagenómicas devido à capacidade de leitura de extensos fragmentos.

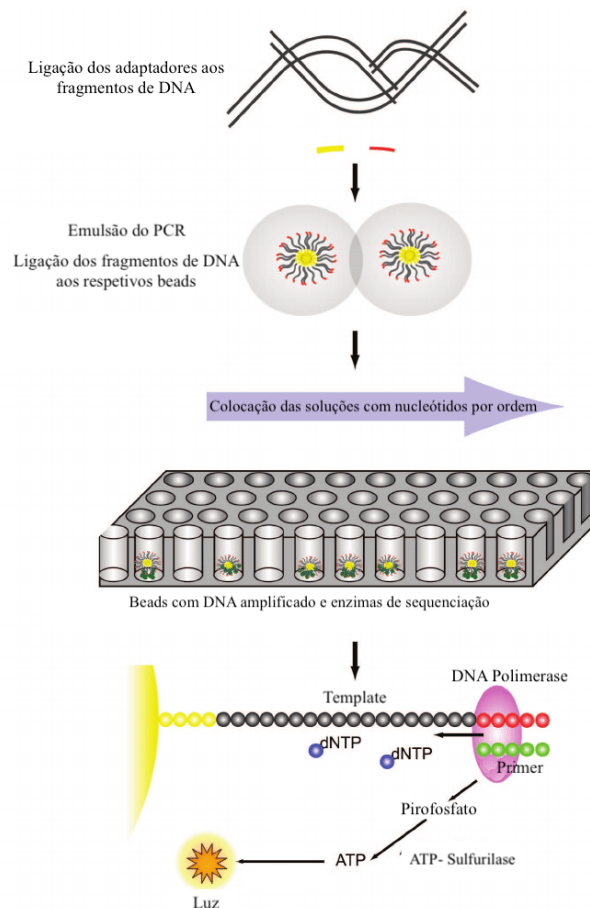


Figura 4 - Etapas da técnica de Pirosequenciação. Adaptado de: (Voelkerding et al., 2009).

Segundo (Gu et al., 2019), as plataformas de sequenciação Illumina são as mais populares e utilizadas na maioria dos estudos publicados sobre microbioma (iSeq, MiSeq, MiniSeq, NextSeq, HiSeq e NovaSeq). Todas estas plataformas usam a estratégia de amplificação

por pontes, onde moléculas individuais de DNA são ligadas a uma célula de fluxo, posteriormente amplificadas e organizadas sob a forma de clusters. Seguidamente dá-se a sequenciação por síntese, que constrói o DNA complementar, com um nucleótido por ciclo, e é feita a leitura ótica da fluorescência transmitida pelos marcadores, previamente colocados nesses nucleótidos, à medida que os nucleótidos complementares se vão ligando à cadeia, de forma a determinar a sua identidade (Gu et al., 2019), como está representado na Figura 5.

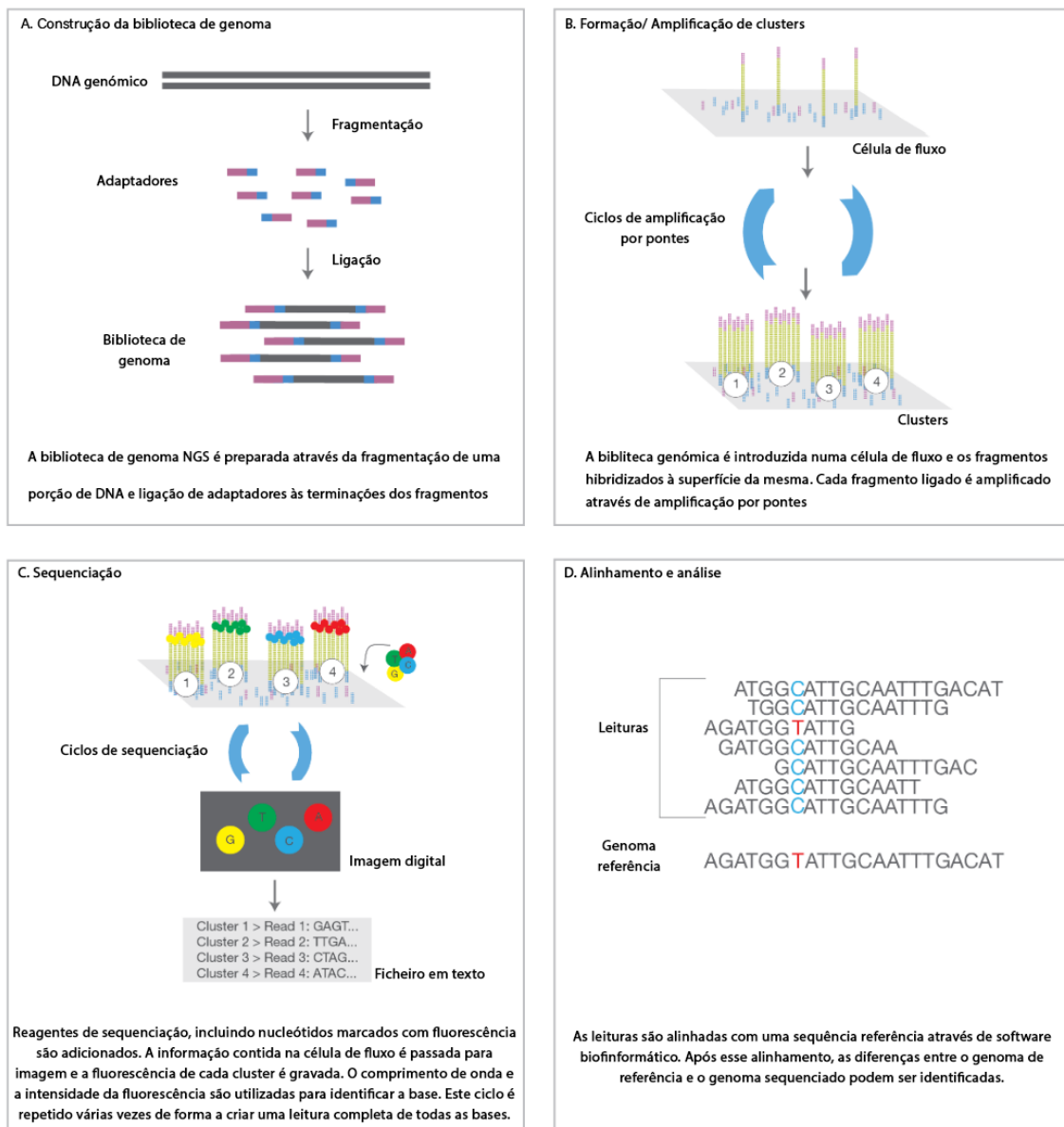


Figura 5 - Etapas da tecnologia de sequenciação de última geração Illumina. Adaptado de: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

Ao contrário da sequenciação dos genes do 16S rRNA, a técnica metagenômica permite, identificar microrganismos e obter informação todos os genes microbianos presentes nas amostras e fazer uma caracterização funcional do microbioma (Boers et al., 2019), como está representado na Figura 6. Este análise permite ainda a deteção de qualquer agente patogénico, sem haver a necessidade de uma amplificação de uma região específica de um gene (Schlaberg et al., 2017).

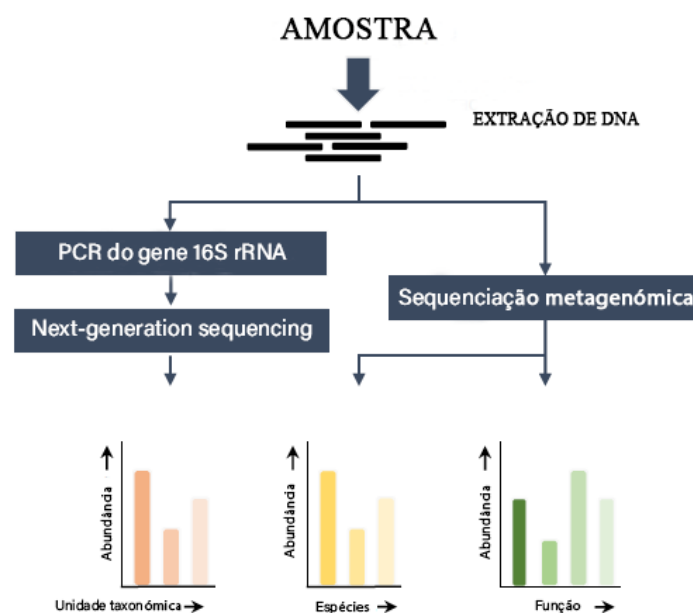


Figura 6 - Comparação dos resultados que se podem obter utilizando sequenciação NGS dos genes 16S rRNA e de todos os genes de todos os microrganismos existentes numa amostra (metagenômica). Adaptado de: (Boers, Jansen, et al., 2019).

A sequenciação metagenômica por NGS envolve uma série de passos, nomeadamente a recolha de amostras, a preparação da biblioteca de genoma e todos os passos de sequenciação. Após a sequenciação, é feita uma análise bioinformática e a interpretação da informação proveniente da sequenciação no laboratório computacional, como se pode observar na Figura 7 (Gu et al., 2019).

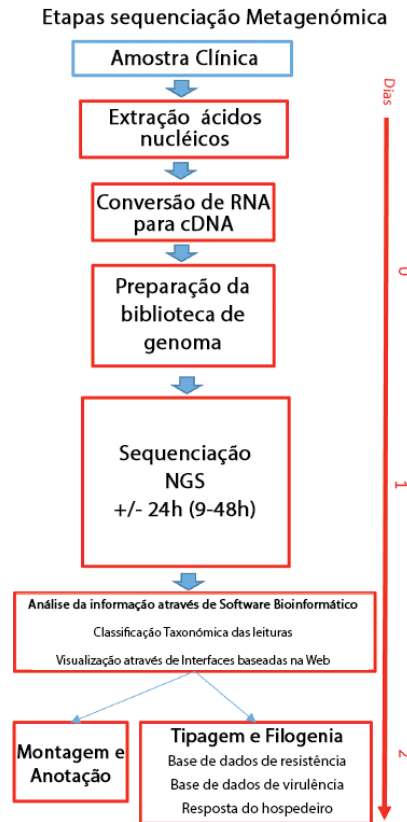


Figura 7 - Etapas da Metagenômica através de NGS. Adaptado de: (Simner et al., 2018).

Uma das grandes vantagens da utilização da técnica metagenômica é a identificação de agentes patogênicos amplamente conhecidos, bem como a descoberta de novos microrganismos.

O limite de detecção nas técnicas de sequenciação NGS depende da profundidade de cobertura, mas podem chegar abaixo de 1%, o que não se verifica no caso da sequenciação mais básica que varia entre 5% e 20% (Ilyas, 2018).

Resumindo, as técnicas de sequenciação têm vindo a evoluir drasticamente devido à grande necessidade de conhecer o microbioma presente em determinadas patologias, neste caso uma patologia associada à cavidade oral que é a peri-implantite, de modo que seja possível saber quais os microrganismos presentes na superfície dos implantes em casos de doença peri-implantar para que, futuramente, seja possível um diagnóstico precoce e um tratamento amais adequado e específico para esta patologia. A informação disponível está um pouco dispersa, com algumas divergências nas suas conclusões, e um pouco insuficiente, devido ao facto de a forma como os estudos são executados não ser homogenia, seja pela tecnologia de sequenciação utilizada, seja pela porção do gene

sequenciada, podendo até ser pelo método de recolha da amostra ou pela base de dados utilizada como referência para identificação dos microrganismos. Sendo assim necessário reunir a informação de todos os estudos executados de forma semelhante, tentando chegar ao objetivo primordial, tentar reunir o máximo de informação possível sobre o microbioma principal da superfície implantar saudável e com peri-implantite.

5. Objetivos

Esta revisão sistemática teve aos seguintes objetivos:

- Caracterizar o microbioma peri-implantar em saúde com base na informação publicada nos últimos 5 anos (2016-2021).
- Caracterização do microbioma peri-implantar na peri-implantite com base na informação publicada nos últimos 5 anos (2016-2021).
- Comparar os microbiomas peri-implantar e da peri-implantite.

II. Materiais e métodos

1. Fontes de informação

Na procura de resposta aos objetivos supramencionados procedeu-se à formulação questão PICO (P- *population*; I- *intervention*; C- *comparison*; O- *outcome*), para que a pesquisa efetuada fosse o mais concreta e concisa possível:

- *Population*: Pacientes com reabilitação implantar
- *Intervention*: Caracterização do microbioma peri-implantar
- *Comparison*: Microbioma peri-implantar e na peri-implantite
- *Outcome*: Impacto do microbioma no tempo de semivida dos implantes

Toda a pesquisa efetuada neste estudo foi feita através da base de dados PubMed. Foram utilizados os seguintes termos para efetuar a pesquisa: ((Peri-implantitis) and (microbiome); (Oral Implant) and (microbiome); (Peri-implantitis) and (microbiome) and (NGS)). Na pesquisa foram colocados filtros ao nível temporal de artigos publicados apenas nos últimos 5 anos (2016 a Junho de 2021).

2. Seleção de estudos

Dois revisores independentes (André Silva e Nuno Taveira) fizeram a análise dos estudos que surgiram como resultados durante todas as fases da pesquisa. Foram introduzidos os artigos, da pesquisa efetuada inicialmente, na plataforma Mendeley® e através desta removidos os duplicados. Os artigos que permaneceram dessa pesquisa primária foram introduzidos na plataforma Rayyan, onde os seus títulos e respetivos resumos/abstracts foram lidos de forma a fazer a sua inclusão ou exclusão da revisão. Após esta análise, foi executada uma leitura completa dos artigos que cumpriram todos os critérios de inclusão. Todos os estudos que não tivessem sido efetuados em humanos foram excluídos. Outro dos critérios de exclusão foi estudos não escritos e publicados em inglês. Esta revisão sistemática teve como critérios de inclusão:

- Estudos realizados em amostras constituídas por pessoas de todas as idades e de ambos os sexos;
- Estudos cuja área de intervenção incida em Implantologia/Periodontologia;
- Estudos realizados apenas em humanos;
- Estudos que avaliem de que maneira o microbioma peri-implantar influencia a durabilidade do implante;
- Estudos que avaliam quais as bactérias que colonizam a superfície peri-implantar através de um método Next Generation Sequencing;
- Estudos escritos apenas em inglês;
- Apenas estudos primários e realizados nos últimos 5 anos;

3. Recolha de informação e síntese

A informação recolhida dos estudos incluídos nesta revisão foi o nome dos autores dos mesmos, ano da sua publicação, o país/cidade onde foi conduzida toda a investigação, o tipo de estudo que foi feito, o número de voluntários que participaram, a tecnologia de caracterização do microbioma utilizada (sequenciação do 16S rRNA ou do genoma integral), o método de recolha da placa bacteriana e, por fim, os dados microbiológicos presentes em cada um deles, sendo esta a informação fundamental para a execução desta revisão. Toda a informação recolhida destes estudos foi então reunida e compilada em várias tabelas de evidência e ordenada pela ordem alfabética de acordo com o nome dos autores dos mesmos. A informação foi dividida por quatro tabelas, na medida em que duas tabelas falam dos dados microbiológicos encontrados nos casos de saúde peri-implantar (Tabela 2 e Tabela 3) e as restantes duas tabelas falam dos dados microbiológicos encontrados nos casos de peri-implantite (Tabela 4 e Tabela 5). Estas por sua vez dividem-se pelo tipo de estudo, sendo numa das tabelas apenas colocada a informação proveniente de estudos Coorte (Tabela 2 e Tabela 4) e nas outras os estudos do tipo Ensaio Clínico Randomizado e Estudos Caso-controlo (Tabela 2 e Tabela 4).

III. Resultados e Discussão

1. Seleção dos estudos

Uma pesquisa efetuada no PubMed, permitiu a obtenção de 130 resultados, após remoção dos seus respectivos duplicados. De entre estes estudos encontrados, após a leitura de todos os títulos e resumos, apenas 45 cumpriram a maior parte dos critérios de inclusão e foram elegíveis para uma leitura integral. Destes, apenas 21 cumpriram todos os critérios de inclusão e foram considerados para inclusão nesta revisão sistemática (Figura 8).

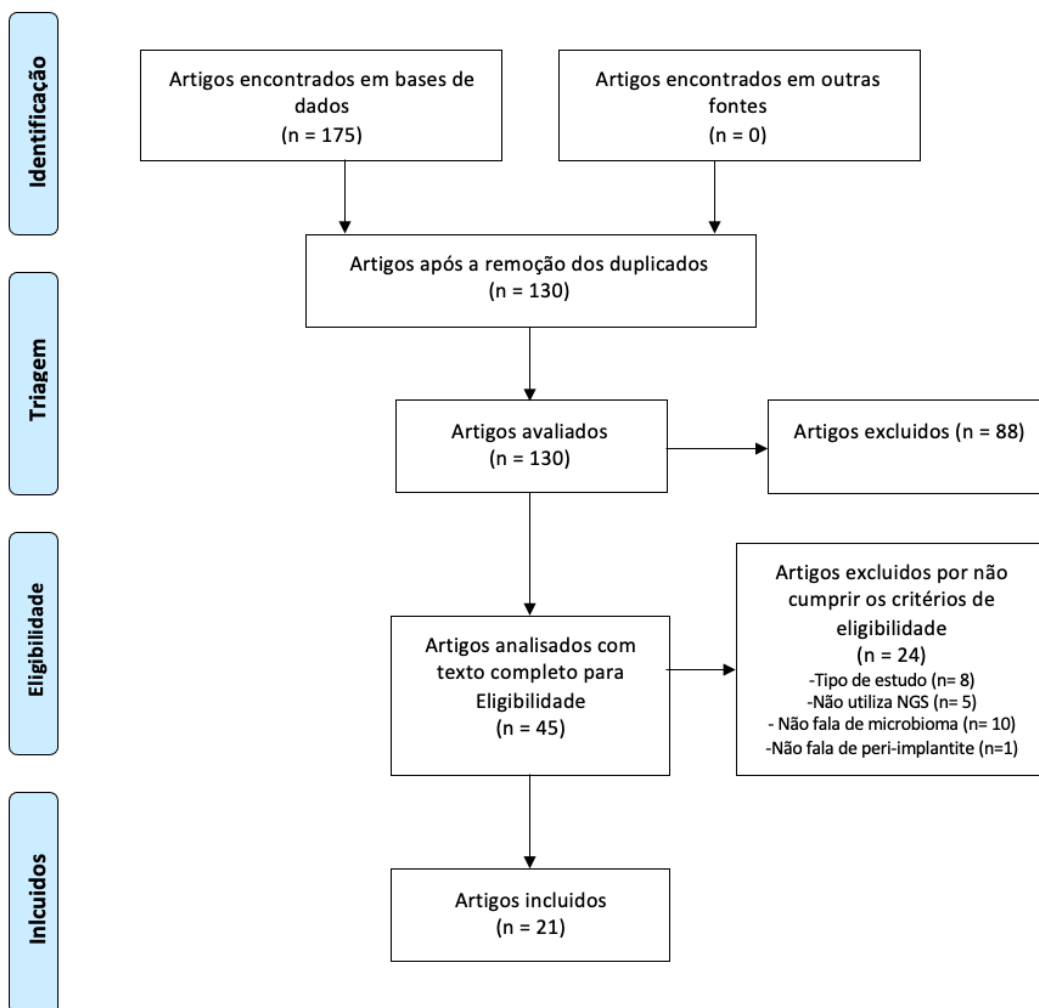


Figura 8 - Diagrama de fluxo do PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis).

2. Análise descritiva

2.1. Aspetos metodológicos

Nesta revisão sistemática foram incluídos estudos clínicos (Tabelas 3 e 5), estudos coorte (Tabelas 2 e 4) e estudos de caso-controlo (Tabelas 3 e 5). Todos os artigos incluídos nesta revisão foram publicados nos últimos 5 anos, sendo que cinco destes foram publicados nos últimos 2 anos (de Freitas et al., 2021; Ghensi et al., 2020; Komatsu et al., 2020; Nie et al., 2020; Rubino et al., 2021; Wang et al., 2021; Yu et al., 2019).

Dentro dos estudos nesta revisão, uns comparam o microbioma em saúde peri-implantar e na peri-implantite (Al-Ahmad et al., 2018; Apatzidou et al., 2017; D. Daubert et al., 2018; Gao et al., 2018; Ghensi et al., 2020; Kröger et al., 2018; Nie et al., 2020; Ignacio Sanz-Martin et al., 2017; Sousa et al., 2017; Vankov et al., 2016; Yu et al., 2019), enquanto outros fazem apenas a caracterização do microbioma no caso de saúde peri-implantar (Cortés-Acha et al., 2017; de Freitas et al., 2021; De Freitas et al., 2018; De Melo et al., 2017; Desch et al., 2020; Duan et al., 2017), e outros caracterizam apenas o microbioma no caso de peri-implantite (Canullo et al., 2017; Komatsu et al., 2020; Wang et al., 2021). Há ainda dois dos estudos que comparam o microbioma da peri-implantite com a periodontite (Sousa et al., 2017; Yu et al., 2019). Em relação ao número de participantes nos estudos incluídos, estes variaram entre quatro (De Melo, Do Nascimento, Souza, & de Albuquerque, 2017) e cento e treze (Ghensi et al., 2020). As amostras biológicas/placa bacteriana foram colhidas através de cones de papel em onze dos estudos presentes (fluido subgingival crevicular) (Al-Ahmad et al., 2018; Apatzidou et al., 2017; Canullo et al., 2017; de Freitas et al., 2021; De Freitas et al., 2018; Gao et al., 2018; Komatsu et al., 2020; Kröger et al., 2018; Rubino et al., 2021; Wang et al., 2021; Yu et al., 2019) e através de Curetas de Gracey nos restantes seis estudos (placa bacteriana subgingival) (D. Daubert et al., 2018; De Melo et al., 2017; Ghensi et al., 2020; Nie et al., 2020; Sanz-Martin et al., 2017; Sousa et al., 2017). Quatro dos estudos em análise efetuaram a colheita da amostra de forma diferente, um deles recorreu à centrifugação de um pilar utilizado em boca pelos pacientes que participaram no estudo (Cortés-Acha et al., 2017), outro recorreu a um instrumento esterilizado não especificado (Vankov et al., 2016), um outro recorreu à utilização de uma goteira com discos de titânio

por parte dos pacientes (Desch et al., 2020) e há ainda um dos estudos que recorreu apenas à saliva da boca dos pacientes em participação (Duan et al., 2017). A caracterização do microbioma fez-se na sua maioria pela sequenciação NGS do gene 16S rRNA, usando a tecnologia Illumina MiSeq (Apatzidou et al., 2017; de Freitas et al., 2021; De Melo et al., 2017; Duan et al., 2017; Gao et al., 2018; Komatsu et al., 2020; Kröger et al., 2018; Sanz-Martin et al., 2017; Sousa et al., 2017; Yu et al., 2019); três estudos utilizaram o método de Pirosequenciação 454 Roche do gene 16S rRNA (Cortés-Acha et al., 2017; D. Daubert et al., 2018; de Freitas et al., 2018; Nie et al., 2020; Vankov et al., 2016); um estudo utilizou o método de PacBio do gene 16S rRNA (Desch et al., 2020) e três estudos utilizaram sequenciação metagenómica (Cortés-Acha et al., 2017; Ghensi et al., 2020; Komatsu et al., 2020).

2.2. Composição da microbiota

Esta revisão sistemática teve como objetivo reunir e compilar toda a evidência científica disponível, publicada nos últimos 5 anos, na qual tenha sido utilizada a sequenciação NGS do gene 16S rRNA, ou sequenciação metagenómica, para analisar o microbioma presente ao redor dos implantes, quer em situação de saúde peri-implantar quer em situação de peri-implantite, sendo que os resultados estão descritos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

O estudo de Al-Ahmad et al., (2018) (Tabelas 3 e 5) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu na Alemanha, que procurou avaliar a composição do microbioma nos estados de peri-implantite e saúde peri-implantar. Este estudo reuniu cerca de 10 indivíduos sistemicamente saudáveis, cada um com pelo menos 1 implante saudável e 1 implante com peri-implantite, perfazendo um total de 20 implantes em estudo. Nenhum dos pacientes sofreu tratamento prévio para a peri-implantite nem periodontite, sendo que as suas idades estavam compreendidas entre os 62 e os 83 anos. A amostra foi recolhida com recurso a cones de papel e por sua vez centrifugada de forma a que o gene 16S rRNA fosse amplificado via PCR e seguidamente sequenciado através da tecnologia LGC genomics, sendo esta uma tecnologia Next-generation sequencing. O estudo demonstrou que em indivíduos com implantes com peri-implantite o filo mais abundante era *Bacteroidetes*, seguido de *Firmicutes* e por fim *Fusobacteria*, sendo que este último foi encontrado em 7 indivíduos com peri-implantite e apenas em 5 no estado saudável. Este

estudo aponta ainda para uma maior abundância relativa dos géneros *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.* e das espécies *Porphyromonas. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* nos indivíduos com peri-implantite. Os autores revelaram que, indivíduos portadores de implantes saudáveis apresentam maior abundância do filo *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes* e por fim *Fusobacteria*. O género *Streptococcus spp.* foi encontrado em maior abundância relativa nos indivíduos portadores de implantes saudáveis, bem como a espécie bacteriana *Veillonella dispar*. O único resultado com significado estatístico foi a maior percentagem de *Bacteroidetes* nos indivíduos com peri-implantite.

O estudo de Apatzidou et al., (2017) (Tabelas 3 e 5) foi um estudo Coorte, que decorreu na Grécia, e avaliou o microbioma saudável e na peri-implantite. Os autores reuniram 10 indivíduos caucasianos, com idades entre 40 e 73 anos, sistemicamente saudáveis, não fumadores, com pelo menos 1 implante com peri-implantite e com história de periodontite prévia e tratamento da mesma. Nove dos dez indivíduos eram parcialmente edêntulos e um totalmente edêntulo. As amostras foram recolhidas de 1 implante em doença peri-implantar e 4 locais no estado de saúde, não adjacentes, através de um cone de papel. A porção V3/V4 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada através de Illumina MiSeq. Este estudo indica que, no geral, as amostras provenientes dos indivíduos com peri-implantite demonstraram uma menor diversidade bacteriana, mas uma maior abundância de cada espécie bacteriana presente. O género bacteriano mais discriminativo entre os estados em análise foi *Actinomyces* e *Streptococcus* nos casos saudáveis e *Prevotella* e *Porphyromonas* nos casos de Peri-implantite. Os filos *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes* e *Synergistetes* foram positivamente associados a profundidades de sondagem mais elevadas, contrariamente aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Proteobacteria* e *Thermi bacteria* que foram associados a profundidades de sondagem mais reduzidas.

O estudo de Canullo et al., (2017) (Tabela 4) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu em Espanha, e avaliou a composição do microbioma nos estados de peri-implantite e saúde peri-implantar. Neste estudo criaram-se dois grupos, um de indivíduos saudáveis e outro de indivíduos com peri-implantite, constituídos por 22 e 25 voluntários respetivamente, com idades compreendidas entre os 25 e os 70 anos. No total 90 implantes foram analisados, sendo que 47 foram classificados como em peri-implantite e

43 no estado saudável, e a amostra foi recolhida com recurso a cones de papel. Neste estudo houve uma maior abundância de espécies bacterianas nos casos de peri-implantite comparativamente aos casos saudáveis. Nos indivíduos com peri-implantite, o microbioma peri-implantar apresentava elevados níveis de espécies bacterianas como: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter concisus*, *Streptococcus spp.*, *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula* e *Enterococcus faecalis*.

O estudo Cortés-Acha et al., (2017) (Tabelas 3 e 5) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu em Espanha, e avaliou a composição do microbioma peri-implantar de indivíduos com história de periodontite e indivíduos completamente saudáveis. Foram recrutados 10 indivíduos, 5 com história de periodontite e 5 saudáveis, com idades compreendidas entre os 45 e os 84 anos. Nos participantes a tampa de cicatrização foi substituída por um pilar, que foi depois centrifugado como forma de recolha da amostra. O microbioma foi analisado através da Pirosequenciação 454 Roche, do gene 16S rRNA, nas regiões V1 a V5. Nos indivíduos com história de periodontite, a evidência de uma maior presença de espécies bacterianas como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella oris*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica*, pela respetiva ordem consoante a sua abundância. Já nos indivíduos completamente saudáveis, as espécies bacterianas mais encontradas, pela sua ordem, foram *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Rothia dentocariosa*, *Prevotella oris* e *Veillonella parvula*. Os autores indicam ainda que a espécie bacteriana mais encontrada foi *Fusobacterium nucleatum* que está sobre representada nos indivíduos saudáveis. Já o género bacteriano *Prevotella* foi o mais comum e a espécie *Prevotella denticola* estava sobre representada nos indivíduos com história de periodontite.

O estudo de Daubert et al., (2018) (Tabela 2 e 4) foi um estudo Coorte, que decorreu nos Estados Unidos, que avaliou a composição do microbioma peri-implantar em pacientes com periodontite portadores de implantes saudáveis e diagnosticados com peri-implantite. Um grupo de 11 pacientes, com idades entre os 61 e os 81 anos, participou neste estudo onde foram analisados 15 implantes dos quais 6 classificados com peri-implantite e 9 classificados como saudáveis. A amostra foi recolhida através de curetas

de Gracey e o microbioma foi caracterizado por sequenciação do gene 16S rRNA através da pirosequenciação Roche 454. Observou-se uma menor diversidade bacteriana do microbioma dos indivíduos com peri-implantite comparativamente ao microbioma de indivíduos saudáveis. Houve uma maior abundância dos géneros *Veillonella* e *Neisseria* no microbioma dos casos de peri-implantite, contrariamente ao que se observou no microbioma saudável onde houve uma maior abundância de géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Prevotella* e *Haemophilus*.

O estudo de Freitas et al., (2018) (Tabela 3) foi um Caso-controlo, que decorreu no Brasil, que procurou avaliar o diferente microbioma oral em duas diferentes superfícies implantares titânio e zircónia. 20 participantes sistemicamente saudáveis entraram neste estudo, em que 10 foram reabilitados com pilares de zircónia e os outros 10 com pilares de titânio. A amostra foi recolhida com recurso a cones de papel e a análise do microbioma foi feita pela sequenciação do gene 16S rRNA através da pirosequenciação Roche 454. Independentemente da superfície, a quantidade de espécies bacterianas na zircónia e no titânio foi igual ao longo do tempo. No geral os géneros bacterianos mais encontrados foram *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Nas superfícies de titânio, o filo mais prevalente foi *Chlorophyta* e os géneros igualmente mais prevalentes foram *Neisseria*, *Reinekia* e *Rienerella*. Nas superfícies de zircónia, o filo mais presente foi *Nitrospirae* e os géneros mais presentes foram *Staphylococcus*, *Heliobacterium*, *Odoribacter*, *Faecalibacterium* e *Listeria*.

O estudo de Freitas et al., (2021) (Tabela 3) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu no Brasil, que visou identificar o microbioma oral em duas superfícies diferentes de materiais utilizados nos implantes, neste caso a zircónia e o titânio. Neste estudo participaram 20 indivíduos, em que 10 tinham pilares de zircónia e outros 10 pilares de titânio colocados há 3 anos. A idade dos indivíduos era compreendida entre os 18 e os 69 anos. A amostra de biofilme supragengival foi retirada com um microbrush e a amostra subgengival com cones de papel. O microbioma foi analisado pela sequenciação do gene 16S rRNA, na região V3 e V4 através de Illumina MiSeq. No geral a quantidade de espécies bacterianas aumentou com o passar do tempo, durante os 3 anos, sendo mais evidente esse aumento nos pilares de zircónia. O género bacteriano *Porphyromonas* teve o seu nível aumentado exponencialmente no marco temporal dos 2 anos, estando este relacionado com a perda óssea nos pilares de zircónia. O género *Tannerella* aumentou

mais no marco temporal dos 2 anos ao nível supragengival e no marco temporal dos 3 anos ao nível subgengival, estando este género associado à hemorragia à sondagem nos indivíduos com peças em titânio e a uma maior profundidade de sondagem nos indivíduos com peças em zircónia. Já o nível do género bacteriano *Treponema* aumentou exponencialmente no marco temporal dos 2 anos, estando este associado a uma maior profundidade de sondagem nos indivíduos com pilares em zircónia.

O estudo de De Melo et al., (2017) (Tabela 2) foi um estudo Coorte, que decorreu no Brasil, que procurou caracterizar o perfil do microbioma oral que coloniza as superfícies implantares de titânio. Neste estudo participaram 4 pessoas às quais foi pedido que utilizassem durante 24h uma goteira com 4 discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície, perfazendo um total de 16 discos para amostragem. O biofilme aderido aos discos no final das 24h foi recolhido com recurso a curetas de Gracey e o seu microbioma analisado pela sequenciação do gene 16S rRNA através de Illumina MiSeq. Os autores concluíram assim que os filos bacterianos mais prevalentes foram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Synergistetes*, sendo o primeiro o mais prevalente.

O estudo Desch et al., (2020) (Tabela 2) foi um estudo Coorte *in vivo*, que decorreu no Brasil, e avaliou a diversidade do microbioma oral nos pilares de zircónia e titânio. Neste estudo participaram 12 pacientes, com idades entre os 20 e os 35 anos, sistemicamente saudáveis e não fumadores. Aos pacientes foi pedido que utilizassem uma goteira com 4 discos de titânio e 4 discos de zircónia durante 5 dias. Estas goteiras foram analisadas e colhida uma amostra passado 6 horas, 24 horas, 3 dias e 5 dias após a sua utilização. O microbioma do biofilme recolhido foi analisado pela sequenciação do gene 16S rRNA, nas regiões V1 a V9, pelo método PacBio. Houve um aumento da diversidade bacteriana em ambos os materiais ao longo do tempo do estudo. A evidência mostrou que os filos bacterianos mais abundantes, por ordem decrescente da sua abundância foram *Firmicutes*, seguido de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Candidatus saccharibacteria* e, por fim *Fusobacteria*. Os géneros bacterianos mais prevalentes, novamente por ordem decrescente da sua prevalência, foram *Streptococcus*, seguido por *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Gamella* e finalmente *Abiotrophia*. Já ao nível das espécies bacterianas mais abundantes, por ordem decrescente da sua abundância, verificou-se a presença de

Streptococcus mitis, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus infantis* e por fim *Streptococcus pseudopneumoniae*.

O estudo de Duan et al., (2017) (Tabela 3) foi um estudo clínico prospetivo, que decorreu na China, e avaliou o microbioma salivar de indivíduos portadores de implantes dentários, fumadores e não fumadores. Este estudo englobou a participação de 20 pessoas, das quais 10 eram fumadores e as restantes 10 não fumadoras, com idades compreendidas entre os 29 e os 60 anos. O microbioma oral presente nas amostras salivares foi analisado pela sequenciação do gene 16S rRNA, na região V4, através de Illumina MiSeq. Neste estudo os autores evidenciaram uma menor diversidade e abundância de espécies bacterianas no microbioma salivar dos indivíduos não fumadores. Os filos mais abundantes presentes no microbioma oral salivar em geral são *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Synergistetes*, *Saccharibacteria*, *Spirochaetes*, *Gracilibacteria* e *Tenericutes*. Mais especificamente os filos *Proteobacteria*, *Saccharibacteria* e *Gracilibacteria* apresentam maior prevalência no grupo de indivíduos não fumadores, já o filo *Synergistetes* apresentou mais prevalência no grupo de indivíduos fumadores. Ao nível do género bacteriano, os géneros mais prevalentes nos indivíduos fumadores são *Streptococcus*, *Lachnoanaerobaculum*, *Stomatobavulum* e *Eubacterium nodatum*, enquanto no grupo de participantes não fumadores, *Selenomonas* e *Catonella* foram os géneros bacterianos mais prevalentes. As espécies bacterianas mais abundantes nos casos de indivíduos fumadores são *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Eubacterium infirmum* e *Megasphaera micronuciformi*, enquanto nos não fumadores, *Catonella morbi*, *Oribacterium assacchorolyticum* e *Solobacterium moorei*. Nos casos das espécies bacterianas encontradas apenas no microbioma oral salivar de indivíduos não fumadores, temos o exemplo de *Selenomonas sputigena*, *Acinetobacter bohemicus*, *Saccharibacteria*, *Pseudomonas orientalis* e *Vibrio gigantis*. Relativamente às espécies já conhecidas como causadores da doença periodontal/peri-implantar, as bactérias associadas ao complexo vermelho, como é o caso de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram encontradas com os seus níveis mais elevados no microbioma salivar dos indivíduos fumadores.

O estudo de Gao et al., (2018) (Tabelas 3 e 5) foi um estudo Caso-controlo que procurou avaliar a variação do microbioma oral peri-implantar entre implantes saudáveis e com peri-implantite. 40 participantes fizeram parte deste estudo, com médias de idades entre

os 39 e os 45 anos, que por sua vez foram divididos entre grupo de controlo e grupo de caso. Foram recolhidas amostras do fluido crevicular subgengival através de cones de papel de cada um destes indivíduos e o seu microbioma analisado com recurso à sequenciação da região V3-V4 do gene 16S rRNA através de Illumina MiSeq. Quanto ao microbioma propriamente dito, observou-se uma maior presença de bactérias do filo *Actinobacteria*, da classe bacteriana *Actinomyces*, da família bacteriana *Moraxellaceae* e do género *Acinetobacter*, nos indivíduos do grupo com peri-implantite, comparativamente aos indivíduos saudáveis. Mais especificamente, quanto aos géneros bacterianos mais dominantes, nos indivíduos do grupo de controlo, ou seja, sujeitos saudáveis, estes foram *Neisseria*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Campylobacter*, *Rothia* e *Granulicatell*, por ordem de prevalência. No caso dos sujeitos pertencentes ao grupo de caso, ou seja, indivíduos com peri-implantite, foi detetada uma dominância dos géneros bacterianos *Prevotella*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Leptothrix*, *Capnocytophaga*, *Micrococcus*, *Rothia*, *Moraxella*, *Haemophilus* e *Actinomyces*.

O estudo de Ghensi et al., (2020) (Tabelas 2 e 4) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu em Itália, em que se avaliou o microbioma dos indivíduos em saúde peri-implantar e em indivíduos com peri-implantite. Neste estudo participaram 113 pacientes, divididos por 3 grupos, um grupo de 35 pacientes com implantes saudáveis, um grupo de 37 pacientes com implantes com mucosite e um outro grupo com 41 indivíduos com peri-implantite. Foi retirado biofilme subgengival com recurso a curetas de Gracey e foi analisado o seu microbioma com recurso à sequenciação do gene 16S rRNA por Illumina HiSeq-2000 e sequenciação metagenómica. Observou-se uma clara distinção entre os microbiomas saudável e da peri-implantite, sendo que o microbioma oral saudável foi mais rico e abundante a nível de espécies bacterianas, havendo também uma maior variabilidade desse microbioma entre os indivíduos do mesmo grupo. No microbioma da peri-implantite observou-se uma alta prevalência da espécie *Tannerella forsythia* e *Treponema lecithinolyticum*. Estas espécies estavam também presentes no microbioma dos indivíduos saudáveis, mas em menor quantidade, juntamente com *Treponema socranskii* e *Fusobacterium nucleatum*. As espécies bacterianas *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* apresentam um elevado efeito patogénico, consoante a sua abundância. Nos indivíduos com peri-implantite, observou-se uma

exacerbada presença de *Treponema maltophilum*, *Fretibacterium fastidiosum*, *Pseudoramibacter alacolyticus* e *Treponema lecithinolyticum* comparativamente aos indivíduos saudáveis. Foram definidos ainda dois complexos de espécies bacterianas, um deles altamente associado à saúde peri-implantar composto por *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga ochracea*, *Selenomonas noxia* e *Selenomonas artemidis*, juntamente com os géneros bacterianos mais associados à saúde implantar como é o caso de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Rothia* e *Streptococcus*. O complexo associado à doença peri-implantar, é composto por espécies bacterianas como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, com maior efeito patogénico quanto maior a sua abundância, juntamente com *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium fastidiosum*, *Filifactor alocis*, *Desulfobulbus spp.* e *Treponema lecithinolyticum*. Neste estudo associou-se a maior abundância de *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* com a maior severidade da peri-implantite.

O estudo de Komatsu et al., (2020) (Tabela 4) foi um estudo Coorte, que decorreu no Japão, e avaliou as diferenças do microbioma entre a peri-implantite e a periodontite. Neste estudo participaram 21 pacientes sistemicamente saudáveis e não fumadores, com média de idades de 67 anos. Foi recolhida uma amostra do fluido gengival crevicular destes pacientes com cones de papel e o seu microbioma foi analisado com recurso à sequenciação do gene 16S rRNA por Illumina MiSeq. Observou-se um nível mais elevado das espécies bacterianas *Peptostreptococcus stomatis*, *Leptotrichia sp.*, *Solobacterium moorei* e *Prevotella denticola*, no microbioma da peri-implantite, comparativamente ao saudável, sendo que esta última é apenas encontrada nos indivíduos com peri-implantite. Neste estudo *Prevotella denticola*, *Solobacterium moorei*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fretibacterium fastidiosum* são consideradas como bactérias específicas da peri-implantite.

O estudo de Kröger et al., (2018) (Tabela 4) foi um estudo Coorte, que decorreu na Alemanha, e avaliou o microbioma em diferentes níveis de severidade da peri-implantite. Neste estudo participaram 30 pessoas com idades compreendidas entre os 32 e os 82 anos. Uma amostra de fluido gengival crevicular destes pacientes foi recolhida utilizando um cone de papel e o seu microbioma foi analisado através da sequenciação do gene 16S rRNA, na região V3, por Illumina MiSeq. A abundância das espécies bacterianas

Eubacteriaceae, *Fretibacterium* sp., *Fretibacterium fastidiosum*, *Peptostreptococcaceae*, *Alloprevotella* sp., *Fastidiosipila sanguinis*, *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcaceae*, *Bacteriodetes bacterium*, *Treponema parvum*, *Clostridiales bacterium* e *Orobacterium* foi maior em profundidades de sondagem mais elevadas. Já as espécies bacterianas *Selenomonas* sp., *Granulicatella elegans*, *Rothia aeria*, *Corynebacterium durum*, *Veillonella dispar*, *Acinetobacter*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella parvula*, *Bifidobacterium*, *Bergeyella*, *Veillonella rogosae*, *Neisseria*, *Veillonella atypica*, *Rhodobacteriaceae*, *Lautropia mirabilis* e *Oribacterium asaccacolyticum* demonstraram estar menos abundantes nas profundidades de sondagem mais elevadas.

O estudo de Nie et al., (2020) (Tabela 3 e 5) foi um estudo Caso-controlo, que decorreu na China, e analisou a influencia do tratamento não cirúrgico no microbioma de implantes com peri-implantite. Este estudo contou com a participação de 23 pessoas onde se formou um grupo saudável constituído por 10 pessoas e um grupo com 13 pessoas com peri-implantite. As idades rondaram, em média os 42 e os 47 anos, respetivamente. Neste estudo as amostras foram recolhidas através de curetas e o microbioma analisado por sequenciação do gene 16S rRNA, na região V1-V3, através de pirosequenciação Roche 454. Observou-se uma maior abundância de espécies bacterianas nos indivíduos com peri-implantite, em comparação com indivíduos saudáveis. A abundância relativa de espécies bacterianas como *Campylobacter showae*, *Campylobacter gingivalis*, *Campylobacter leadbetteri*, *Leptotrichia hofstadii*, *Prevotella leoscheii*, *Prevotella tanneriae* e *Streptococcus sanguinis* aumentou nos indivíduos com peri-implantite, comparativamente aos indivíduos saudáveis. As três espécies bacterianas *Tannerella forsythia*, *Campylobacter gracilis* e *Fusobacterium* foram detetadas também, não só em saúde peri-implantar, como em sujeitos com peri-implantite. Comparando o efeito do tratamento não cirúrgico da peri-implantite, os autores evidenciaram influência na sua abundância, pós tratamento, de géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Carynebacterium*, *Selenomonas*, *Campylobacter*, *Poprhyromonas*, *Treponema* e *Eubacterium*. O tratamento levou a uma clara diminuição da abundância de espécies bacterianas como *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Leptotrichia hofstadii*, *Leptotrichia wadei*, *Prevotella tanneriae*, *Rothia aeria* e *Streptococcus sanguinis*.

O estudo de Rubino et al., (2021) (Tabela 2) foi um estudo Coorte, que decorreu nos Estados Unidos, e procurou avaliar o efeito do material de selamento do canal de acesso dos implantes no microbioma oral implantar. Neste estudo participaram 8 pacientes caucasianos, com idades a oscilar entre os 53 e os 73 anos. Todos os pacientes possuíam uma prótese sobre implantes que foi removida e toda a área implantar foi desbridada bem como a lavagem da prótese foi executada, de forma a ser avaliado o seu microbioma passados 6 meses. Após esses 6 meses, a recolha da amostra foi conseguida através de cones de papel e o microbioma foi analisado através da sequenciação do gene 16S rRNA por Illumina MiSeq. Houve apontaram para uma frequente deteção de espécies bacterianas como *Fusobacterium nucleatum*, seguida de espécies do género *Atopobium*, *Streptococcus oralis* e *Lactobacillus johnsonii*. Já o sulco peri-implantar estava dominado pela presença de bactérias do complexo laranja de Socransky (*Caecilia gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium polymorphum*, *Fusobacterium vincentii*, *Fusobacterium periodonticum*, *Micromonas micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*.

O estudo de Sanz-Martin et al., (2017) (Tabelas 2 e 4) foi um estudo Coorte, que decorreu na Suíça, que avaliou o microbioma de indivíduos com saúde peri-implantar e com peri-implantite. Neste estudo participaram 67 pessoas, 35 saudáveis e 32 com peri-implantite. Uma amostra de biofilme subgingival foi retirada de todos os participantes com recurso a curetas de Gracey e o seu microbioma analisado através da sequenciação do gene 16S rRNA, na região V3-V4, por Illumina MiSeq. No geral, em ambas as condições implantares, os autores apontam para a deteção de géneros bacterianos como *Bacteroidetes*, seguido de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* e por fim *Tenericutes*. Observou-se ainda uma maior diversidade bacteriana no microbioma peri-implantar comparativamente ao microbioma saudável. Os implantes dos indivíduos com peri-implantite foram primariamente colonizados por espécies membro dos filós *Bacteroides*, *Spirochetes* e *Synergistetes*, no entanto o microbioma saudável englobou espécies dos filós *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Os géneros bacterianos *Porphyromonas*, *Treponema*, *Filifactor*, *Fretibacterium* e *Tannerella* foram detetados com maior abundância no microbioma da peri-implantite. Em contraste, os géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia* e

Haemophilus apresentaram uma maior abundância relativa no microbioma saudável. O microbioma da peri-implantite englobou altos níveis de espécies bacterianas periodontopatogências clássicas como *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, bem como espécies bacterianas categorizadas recentemente como *Filifactor alocis*, *Fretibacterium fastidiosum* e *Treponema maltophilum*.

O estudo de Vankov et al., (2016) (Tabelas 3 e 5) foi um estudo Coorte, que decorreu na Rússia, e avaliou o microbioma associado aos tecidos peri-implantares saudável e inflamado. Este estudo incluiu a participação de 5 pacientes cuja amostra de biofilme foi recolhida através de um instrumento cirúrgico esterilizado. O microbioma foi analisado através da pirosequenciação 454 Roche, do gene 16S rRNA, regiões V1 a V3. O estudo demonstrou, na generalidade, bactérias dos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Synergistetes*. Mais especificamente o filo *Firmicutes* demonstrou ser mais abundante no microbioma saudável do que no microbioma não saudável. O filo *Bacteroidetes* demonstrou ser mais abundante no microbioma não saudável, bem como os filos *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* que se demonstraram também mais abundantes no microbioma não saudável. Em adição, os géneros *Paludibacter* e *Veillonella* demonstraram também uma maior abundância no microbioma dos tecidos peri-implantares não saudáveis. Já o género *Streptococcus* dominou nos dois tipos de microbioma em estudo, com predominância no microbioma saudável.

O estudo de Sousa et al., (2017) (Tabelas 2 e 4) foi um estudo Coorte, que decorreu em Inglaterra, e avaliou o microbioma bacteriano no biofilme periodontal e peri-implantar em pacientes com história de periodontite agressiva, tanto nos casos de saúde e doença. Este estudo envolveu a participação de 18 sujeitos, com idades entre os 28 e 56 anos, dos quais vários tipos de amostras foram retirados, recorrendo a curetas de Gracey, nomeadamente amostras de microbioma de bolsas periodontais, de locais periodontalmente saudáveis, de dentes dos pacientes dos quais foram também colhidas amostras implantares, locais com peri-implantite, locais com peri-mucosite e locais com tecido peri-implantar saudável. O microbioma presente nestas amostras foi analisado através da sequenciação do gene 16S rRNA, na região V5 a V7, por Illumina MiSeq. Tanto ao nível dentário como implantar, foram detetados filos como *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Synergistetes*.

Foram detetados géneros bacterianos presentes apenas no microbioma implantar, nomeadamente *Propionibacterium*, *Paludibacter*, *Staphylococcus*, *Flifactor*, *Mogibacterium*, *Bradyhizobium* e *Acinetobacter*. Nos casos de saúde implantar, foram detetados géneros bacterianos como *Acinetobacter* e *Veillonella*. Já no microbioma da peri-implantite foram detetados géneros bacterianos como *Treponema* e *Bradyhizobium*.

O estudo de Wang et al., (2021) (Tabela 4) foi um estudo Coorte, que decorreu nos Estados Unidos, e avaliou a influência do tratamento periodontal cirúrgico no microbioma da peri-implantite. Este estudo contou com a participação de 24 indivíduos, aos quais foi efetuada uma cirurgia de desbridamento implantar e feitas consultas de follow-up às 2 e 4 semanas e depois aos 3 e 6 meses após a cirurgia. A amostra foi colhida com recurso a cones de papel e o seu microbioma analisado pela sequenciação do gene 16S rRNA por QIIME2. Este estudo fez uma distinção entre indivíduos de baixo risco, médio e alto risco de contraírem doença peri-implantar e definiu algumas espécies bacterianas associadas a estes níveis de risco. No caso dos indivíduos de baixo risco, o género *Oribacterium* foi mais frequente. Nos casos de indivíduos com risco médio de contrair doença peri-implantar, os géneros *Desulfobulbus*, *Gemella*, *Pseudonomas*, *Chloroplast* e *Filifactor* foram detetados em maior número. Nos indivíduos de maior risco, foram detetadas, de forma mais prevalente as espécies bacterianas *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*, bem como bactérias pertencentes às famílias *Anaerovoracaceae* e *Erysipelatoclostridiaceae*. Após a cirurgia, os níveis de *Fusobacterium nucleatum* desceram significativamente, nos indivíduos de baixo risco, e as espécies bacterianas *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas* sp. e *Prevotella oralis* tornaram-se praticamente indetetáveis nos indivíduos de baixo risco. No mesmo seguimento, as espécies *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* baixaram de nível drasticamente após a cirurgia.

O estudo de Yu et al., (2019) (Tabela 2 e 4) foi um estudo Coorte, que decorreu na China, que caracterizou o microbioma implantar em 18 indivíduos chineses com periodontite e peri-implantite. Foi recolhido fluido crevicular subgingival através de cones de papel de cada indivíduo de bolsas periodontais e locais com peri-implantite, locais em saúde peri-implantar e em saúde periodontal. O microbioma foi avaliado com recurso à sequenciação 16S rRNA, na região V3 e V4, por Illumina MiSeq. Houve uma maior diversidade bacteriana nos casos peri-implantite. Nos casos de peri-implantite foram detetados os

gêneros bacterianos *Spirochaetes* e *Saccharibacteria* em níveis mais elevados quando comparado com o microbioma em saúde. Contrariamente ao observado em saúde peri-implantar, em que gêneros bacterianos como *Proteobacteria* foram detetados em níveis mais elevados. Foram detetados níveis elevados do Filo *Bacteroidetes* no microbioma não saudável, e das espécies *Prevotella denticola*, *Prevotella multififormis* e *Prevotella fusca*, tal como *Johnsonella* e *Moraxella*. No microbioma dos indivíduos saudáveis, *Neisseria oralis* e *Prevotella spp.* foram encontradas num nível mais elevado comparativamente ao microbioma em doença. As grandes diferenças encontradas entre o microbioma implantar saudável e da peri-implantite foi a redução de espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* e um enriquecimento em *Porphyromonas spp.*, *Tannerella*, *Fretibacterium spp.* e *Treponema spp.*

Em resumo, estes estudos assinalam a existência de várias diferenças quanto à abundância e diversidade bacteriana, nas situações de saúde peri-implantar e na peri-implantite (Apatzidou et al., 2017; Canullo et al., 2017; D. Daubert et al., 2018; Ghensi et al., 2020; Nie et al., 2020; Sanz-Martin et al., 2017; Yu et al., 2019), não havendo ainda um consenso sobre em qual das situações em estudo existe uma maior abundância e diversidade bacteriana.

Por um lado, Apatzidou et al., (2017) e Ghensi et al., (2020) observaram uma maior diversidade bacteriana em casos de saúde peri-implantar quando comparado com situação de peri-implantite. Em Apatzidou et al., (2017) observou-se ainda uma maior diversidade bacteriana nos casos de saúde dos tecidos peri-implantares no entanto também uma maior abundância de cada espécie presente nos casos de peri-implantite. Contrariamente, Canullo et al., (2017), D. Daubert et al., (2018), Nie et al., (2020), Sanz-Martin et al., (2017) e Yu et al., (2019) reportaram a evidência de uma maior diversidade bacteriana em casos de doença peri-implantar comparativamente com casos de saúde peri-implantar.

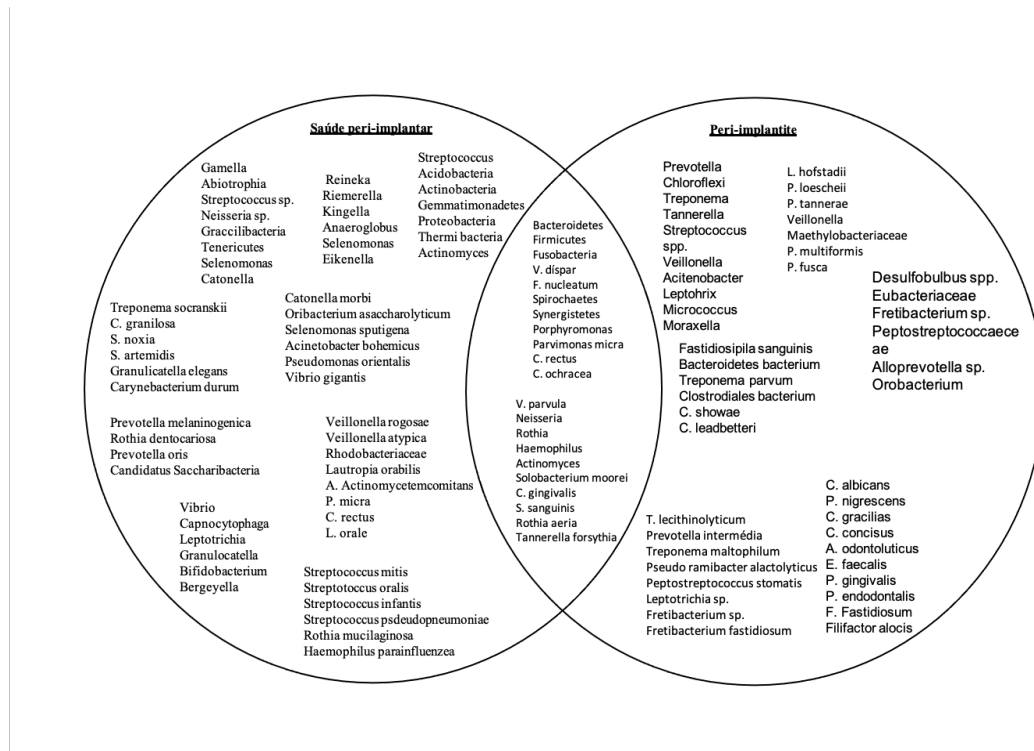


Figura 9 - Diagrama de Venn do microbioma peri-implantar encontrado em saúde, na peri-implantite e em ambos os estados, nos diferentes estudos.

Esquematizando toda a informação de todos os estudos num diagrama de Venn (Figura 9) verifica-se que a maioria dos estudos aponta para uma maior prevalência, nos casos de saúde peri-implantar, de género bacterianos do tipo *Bacteroidetes*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Rothia*, *Haemophilus*, *Veillonella* e por fim *Saccharibacteria*. Em termos de Filos bacterianos do tipo *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Synergistetes* respetivamente pela ordem de prevalência relativamente à menção feita pelos estudos, como pode ser observado na Figura 10 e Figura 11.

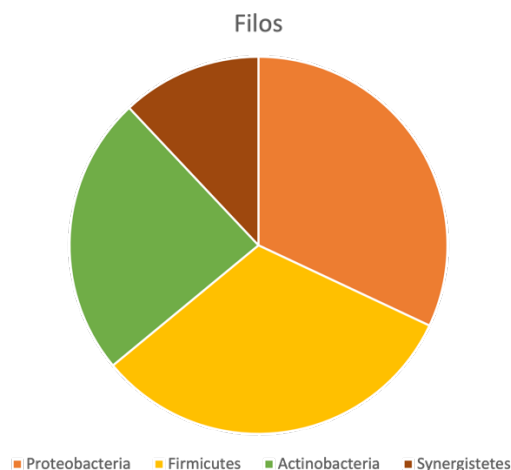


Figura 10 - Prevalência de Filos bacterianos nos casos de saúde peri-implantar de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.

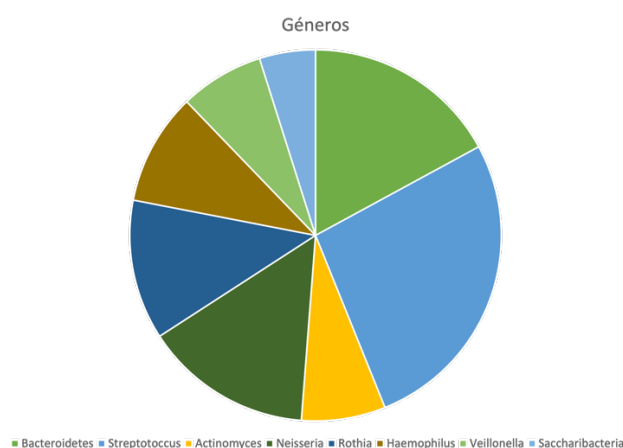


Figura 11 - Prevalência de Gêneros bacterianos nos casos de saúde peri-implantar de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.

No que concerne à peri-implantite na sua maioria, os estudos apontam para uma maior prevalência de gêneros bacterianos do tipo *Tannerella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Prevotella*, *Capnocytophaga* e por fim *Chloroflexi* (Figura 12).

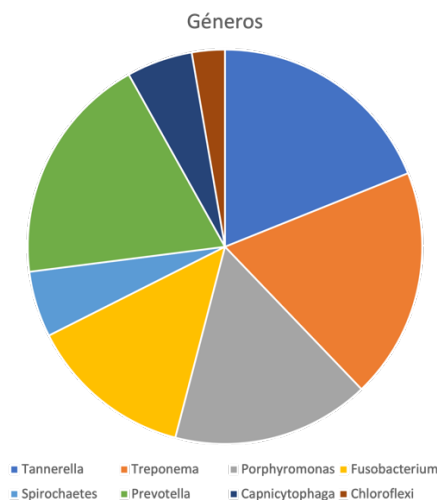


Figura 12 - Prevalência de Gêneros bacterianos nos casos de peri-implantite de acordo com a sua menção nos estudos incluídos.

O microbioma peri-implantar tem vindo a ser cada vez mais um assunto investigado e a procura incessante em conhecer a sua composição, nos casos de doença peri-implantar, nomeadamente na peri-implantite, tem vindo a aumentar, com o intuito de ser possível um diagnóstico mais célere e precoce e um mais adequado tratamento desta patologia.

Com esta revisão foi possível ainda evidenciar o facto de a informação disponível nos diversos estudos ser algo heterogénea, uma vez que diferentes abordagens são tomadas aquando da execução dos estudos clínicos, no âmbito da descoberta da composição do microbioma da saúde peri-implantar e peri-implantite. Estas abordagens podem diferir tanto na severidade da peri-implantite dos indivíduos participantes no estudo, na forma como é recolhida a amostra bacteriana, na forma como é sequenciada a mesma e na forma como são interpretados os resultados, havendo estudos que reportam a constituição do microbioma apenas ao nível dos filós bacterianos, outros que reportam apenas ao nível dos géneros e outros que reportam até ao nível das espécies.

Neste sentido, após o escrutínio de toda a informação descrita nos estudos presentes nesta revisão sistemática, acredita-se que esta fornece informação importante relativamente à evidência científica presente quanto à constituição da microbiota, na saúde peri-implantar e em peri-implantite, podendo ser utilizada também de forma a ajudar e complementar futuras investigações nesse sentido.

Tabela 2 - Características microbiológicas relativas à Saúde peri-implantar em estudos Coorte

Artigo	Tipo de estudo	Saúde peri-implantar (Coorte)			Tecnologia de sequenciação	Método de colheita	Achados microbiológicos
		País/Cidade	Nº de voluntários				
(Apatzidou et al., 2017)	Estudo Coorte	Grécia	10 pacientes		16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo: Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Proteobacteria, Thermi bacteria; Gênero: Actinomyces, Streptococcus
(Daubert, Pozhitkov, McLean, & Kotsakis, 2018)	Estudo Coorte	Washington, Estados Unidos	11 pacientes		16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Gênero: Streptococcus, Prevotella, Haemophilus
(De Melo, Do Nascimento, Souza, & de Albuquerque, 2017)	Estudo Coorte	Canadá	4 pacientes		16S rRNA (Illumina MiSeq)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Gênero: Firmicutes, Proteobacteria, Fusobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Synergistetes, Streptococcus, Neisseria, Kingella, Anaeroglobus, Tannerella, Selenomonas, Eikenella
(Desch et al., 2020)	Estudo Coorte (<i>in vivo</i>)	Hannover, Alemanha	12 pacientes		16S rRNA (PacBio)	Goteira com discos	Filo: Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Candidatus Saccharibacteria, Fusobacteria Gênero: Streptococcus, Neisseria, Rothia, Haemophilus, Gamella, Abiotrophia Espécies: Streptococcus mitis, Streptococcus oralis, Streptococcus infantis, Streptococcus pseudopneumoniae, Streptococcus sp., Neisseria sp., Rothia mucilaginosa, Rothia dentocariosa, Haemophilus parainfluenzae, Streptococcus sanguinis
(Ghensi et al., 2020)	Estudo Coorte	Itália	113 pacientes		16S rRNA (Illumina HiSeq-2000) Metagenômica	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Gênero: Actinomyces, Capnocytophaga, Neisseria, Rothia, Streptococcus; Espécies: Tannerella forsythia, Treponema socranskii, C. gingivalis, C. granulosa, C. ochracea, S. noxia, S. artemidis
(Rubino et al., 2021)	Estudo Coorte	Nova Iorque, Estados Unidos	8 pacientes		16S rRNA (Illumina TruSeq)	Cones de papel (Fluido crevicular subgingival)	Espécies: Fusobacterium nucleatum, Atopobium, Streptococcus oralis, Lactobacillus johnsonii
(Sanz-Martin et al., 2017)	Estudo Coorte	Zurich, Suíça	67 pacientes		16S rRNA (Illumina MiSeq)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Filo: Proteobacteria, Actinobacteria; Gênero: Streptococcus, Veillonella, Rothia, Haemophilus; Espécies: R. dentocariosa, Streptococcus sanguinis, Veillonella dispar;
(Sousa et al., 2017)	Estudo Coorte	Londres, Inglaterra	18 pacientes		16S rRNA (Illumina MiSeq)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Filo: Acinetobacter, Veillonella, Actinobacter, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes
(Yu et al., 2019)	Estudo Coorte	Shanghai, China	18 pacientes		16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo: Proteobacteria, Tannerella, Porphyromonas; Espécies: Neisseria oralis, L. orale, Prevotella sp Streptococcus infantis, Streptococcus mitis, Streptococcus oralis, Fusobacterium sp.;

Tabela 3 - Características microbiológicas relativas à Saúde peri-implantar em Estudos clínicos e em estudos de Caso-controlo

Artigo	Tipo de estudo	Saúde peri-implantar (Outros tipos de estudo)			Método de colheita	Achados microbiológicos
		País/Cidade	Nº de voluntários	Tecnologia de sequenciação		
(Al-Ahmad et al., 2018)	Caso-controlo	Freiburg, Alemanha	10 pacientes	16S rRNA (LGC Genomics)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo: Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria; (ORDEM DE PREVALÊNCIA) Streptococcus; V. dispar
(Cortés-Acha et al., 2017)	Caso-controlo	Barcelona, Espanha	10 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454) Metagenómica	Centrifugação de pilar	Espécies: Fusobacterium nucleatum, Prevotella melaninogenica, Rothia dentocariosa, Prevotella oris, Veillonella parvula
(de Freitas et al., 2018)	Caso-controlo	São Paulo, Brasil	20 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Gênero: Firmicutes, Fusobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Neisseria, Reinekea, Riemerella
(de Freitas et al., 2021)	Caso-controlo	São Paulo, Brasil	20 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Microbrush (Biofilme supragengival) Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Gênero: Porphyromonas, Tannerella, Treponema
(Duan et al., 2017)	Estudo Clínico Prospetivo	Chendgu, China	20 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Saliva	Filo: Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Synergistetes, Saccharibacteria, Spirochaetes, Gracilibacteria, Tenericutes; Gênero: Selenomonas, Catonella; Espécies: Catonella morbi, Oribacterium asaccharolyticum, Solobacterium moorei, Selenomonas sputigena, Acinetobacter bohemicus, Acinetobacter sp., Saccharibacteria sp., Pseudomonas orientalis, Vibrio gigantis;
(Gao, Zhou, Sun, Li, & Zhou, 2018)	Caso-controlo	Urumqi, China	40 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Gênero: Neisseria, Haemophilus, Prevotella, Streptococcus, Vibrio, Porphyromonas, Fusobacterium, Capnocytophaga, Leptotrichia, Actinomyces, Treponema, Campylobacter, Rothia, Granulicatella (ORDEM DE PREVALÊNCIA)
(Nie et al., 2020)	Caso-controlo	Pequim, China	23 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Gênero: Fusobacterium, Leptotrichia, Pseudomonas Espécies: C. gracilis, T. forsythia
(Vankov et al., 2016)	Ensaio Clínico (estudo piloto)	Kazan, Rússia	5 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Instrumento esterilizado (Biofilme subgingival)	Filo: Firmicutes, Bacteroidetes Gênero: Streptococcus, Prevotella

Tabela 4 - Características microbiológicas relativas à Peri-implantite em estudos de Coorte.

Artigo	Tipo de estudo	Peri-implantite (Coorte)		Tecnologia de Sequenciação	Método de recolha	Achados microbiológicos
		Pais/Cidade	Nº de voluntários			
(Apatzidou et al., 2017)	Estudo Coorte	Grécia	10 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo: <i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Spirochaetes</i> , <i>Synergistetes</i> , <i>Treponema</i> , <i>Tannerella</i> ; Género: <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> ;
(Daubert, Pozhitkov, McLean, & Kotsakis, 2018)	Estudo Coorte	Washington, Estados Unidos	11 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Género: <i>Veillonella</i> , <i>Neisseria</i>
(Ghensi et al., 2020)	Estudo Coorte	Itália	113 pacientes	16S rRNA e Metagenómica (Illumina HiSeq-2000)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Espécies: <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>F. fastidiosum</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Desulfobulbus</i> spp., <i>T. lecithinolyticum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema maltophilum</i> , <i>Pseudo ramibacter alactolyticus</i> ;
(Komatsu et al., 2020)	Estudo Coorte	Tóquio, Japão	21 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq) Metagenómica	Cones de papel (Fluido crevicular subgingival)	Espécies: <i>Peptostreptococcus stomatis</i> , <i>Leptotrichia</i> sp., <i>Solobacterium moorei</i> , <i>Prevotella denticola</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fretibacterium fastidiosum</i>
(Kröger et al., 2018)	Estudo Coorte	Bonn, Würzburg, Tübingen, Düsseldorf, Jönköping, Alemanha	30 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Espécies: <i>Eubacteriaceae</i> , <i>Fretibacterium</i> sp., <i>Fretibacterium fastidiosum</i> , <i>Peptostreptococcaceae</i> , <i>Alloprevotella</i> sp., <i>Fastidiosipila sanguinis</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Bacteroidetes bacterium</i> , <i>Treponema parvum</i> , <i>Clostridiales bacterium</i> , <i>Orobacterium</i>
(Sanz-Martin et al., 2017)	Estudo Coorte	Zurich, Suíça	67 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Filo: <i>Bacteroidetes</i> , <i>Spirochetes</i> e <i>Synergistetes</i> ; Género: <i>Porphyromonas</i> , <i>Treponema</i> , <i>Filifactor</i> , <i>Fretibacterium</i> , <i>Tannerella</i> ; Espécies: <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Filifactor alocis</i> , <i>Fretibacterium fastidiosum</i> , <i>Treponema maltophilum</i> ;
(Sousa et al., 2017)	Estudo Coorte	Londres, Inglaterra	18 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Curetas de Gracey (Biofilme subgingival)	Filo: <i>Treponema</i> , <i>Bradyrhizobium</i>
(Wang et al., 2021)	Estudo Coorte	Michigan, Estados Unidos	24 pacientes	16S rRNA (QIIME2)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo (alto risco): <i>Anaerovoracaceae</i> , <i>Erysipelatoclostridiaceae</i> Género (alto risco): <i>Eggerthia</i> , <i>Rikenellaceae</i> , <i>Porphyromonas</i> Espécie (alto risco): <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> Género (risco intermédio): <i>Desulfobulbus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Chloroplast</i> , <i>Filifactor</i> Género (baixo risco): <i>Oribacterium</i>
(Yu et al., 2019)	Estudo Coorte	Shanghai, China	18 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgingival)	Filo: <i>Bacteroidetes</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Spirochaetes</i> , <i>Saccharibacteria</i> Espécies: <i>T. denticola</i> , <i>P. multiformis</i> , <i>P. fusca</i> , <i>Johnsonella</i> sp., <i>Moraxella</i> sp.

Tabela 5 - Características microbiológicas relativas à Peri-implantite em Estudos clínicos e em estudos de Caso-controlo.

Artigo	Tipo de estudo	País/Cidade	Peri-implantite (Outros tipos de estudo)		Método de recolha	Achados microbiológicos
			Nº de voluntários	Tecnologia de Sequenciação		
(Al-Ahmad et al., 2018)	Caso-controlo	Freiburg, Alemanha	10 pacientes	16S rRNA (LGC Genomics)	Cone de papel (Fluido crevicular subgengival)	Filo: Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Prevotella (ORDEM DE PREVALÊNCIA) Espécies: <i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>V. dispar</i> , <i>F. nucleatum</i>
(Canullo et al., 2017)	Caso-controlo	Valencia, Espanha	47 pacientes	16S rRNA	Cones de papel (Fluido crevicular subgengival)	Espécies: <i>Parvimonas micra</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>T. denticola</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. micros</i> , <i>C. rectus</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>C. gracilis</i> , <i>C. ochracea</i> , <i>C. concisus</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>A. odontoliticus</i> , <i>V. parvula</i> , <i>E. faecalis</i>
(Gao, Zhou, Sun, Li, & Zhou, 2018)	Caso-controlo	Urumqi, China	40 pacientes	16S rRNA (Illumina MiSeq)	Cone de papel (Fluido crevicular subgengival)	Género: <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Acitenobacter</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Treponema</i> , <i>Leptohrix</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rothia</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Actinomyces</i> . (ORDEM DE PREVALÊNCIA)
(Nie et al., 2020)	Caso-controlo	Pequim, China	23 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Curetas de Gracey (Biofilme subgengival)	Género: <i>Capnocytophaga</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Parvimonas</i> , Espécies: <i>C. showae</i> , <i>C. gingivalis</i> , <i>C. leadbetteri</i> , <i>L. hofstadii</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. tanneriae</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>Rothia aeria</i>
(Vankov et al., 2016)	Ensaio Clínico (estudo piloto)	Kazan, Rússia	5 pacientes	16S rRNA (Pirosequenciação Roche 454)	Instrumento esterilizado (Biofilme subgengival)	Filo: <i>Fusobacteria</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Paludibacter</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Methylobacteriaceae</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Treponema</i>

IV. Conclusão

A peri-implantite é uma doença dos tecidos circundantes aos implantes, que se considera complexa devido a toda a interação dos fatores desencadeantes da mesma, sejam estes dependentes da resposta imunológica do hospedeiro ou do microbioma presente no local. No que toca ao microbioma, nos vários estudos disponíveis, este varia bastante entre os mesmos, quer ao nível das espécies presentes, quer ao nível de especificidade de deteção reportada pelos mesmos, havendo estudos a reportar ao nível do Filo bacteriano, ao nível do género e mais especificamente ao nível das espécies.

O microbioma da peri-implantite ainda não está estritamente identificado devido à grande variedade de estudos com diferentes conclusões e outcomes. O microbioma associado, tanto à saúde como peri-implantite, é quantitativamente e qualitativamente diferente, embora não haja um consenso entre os estudos sobre qual dos estados possui um microbioma mais diverso ou mais abundante. No entanto, a maior parte dos estudos reportou a evidência de uma maior diversidade bacteriana em casos de doença peri-implantar, comparativamente com casos de saúde peri-implantar.

Posto isto uma investigação mais aprofundada será fulcral para ser possível uma aproximação ou uma conclusão concreta de qual será a microbiota implantar saudável e da peri-implantite.

IV. Bibliografia

- Al-Ahmad, A., Muzaffariy, 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>
- Apatzidou, D., Lappin, D. F., Hamilton, G., Papadopoulos, C. A., Konstantinidis, A., & Riggio, M. P. (2017). Microbiome of peri-implantitis affected and healthy dental sites in patients with a history of chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, *83*, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.07.007>
- Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2018). Peri-implant health. *Journal of Periodontology*, *89*, S249–S256. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0424>
- Berglundh, T., Jepsen, S., Stadlinger, B., & Terheyden, H. (2019). Peri-implantitis and its prevention. *Clinical Oral Implants Research*, *30*(2), 150–155. <https://doi.org/10.1111/clr.13401>
- Boers, S. A., Ruud, J., & Hays, J. P. (2019). Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *66*(5), 778–. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>
- Boers, S. A., Ruud, J., & Hays, J. P. (2019). Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic tool for infectious diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *66*(5), 1059–1070. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>
- Canullo, L., Radovanović, S., Delibasic, B., Blaya, J. A., Penarrocha, D., & Rakic, M. (2017). The predictive value of microbiological findings on teeth, internal and external implant portions in clinical decision making. *Clinical Oral Implants Research*, *28*(5), 512–519. <https://doi.org/10.1111/clr.12828>
- Corrêa, M. G., Pimentel, S. P., Ribeiro, F. V., Cirano, F. R., & Casati, M. Z. (2019). Host response and peri-implantitis. *Brazilian Oral Research*, *33*, 1–13. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0066>
- Cortés-Acha, B., Figueiredo, R., Seminago, R., Roig, F. J., Llorens, C., & Valmaseda-Castellón, E. (2017). Microbiota Analysis of Biofilms on Experimental Abutments Mimicking Dental Implants: An In Vivo Model. *Journal of Periodontology*, *88*(10),

- 1090–1104. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170051>
- Damiati, L., Eales, M. G., Nobbs, A. H., Su, B., Tsimbouri, P. M., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2018). Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *Journal of Tissue Engineering*, 9. <https://doi.org/10.1177/2041731418790694>
- Daubert, D. M., & Weinstein, B. F. (2019). Biofilm as a risk factor in implant treatment. *Periodontology 2000*, 81(1), 29–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12280>
- Daubert, D., Pozhitkov, A., McLean, J., & Kotsakis, G. (2018). Titanium as a modifier of the peri-implant microbiome structure. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 20(6), 945–953. <https://doi.org/10.1111/cid.12676>
- Freitas, A. R., Del Rey, Y. C., de Souza Santos, E., Faria Ribeiro, R., de Albuquerque Junior, R. F., & do Nascimento, C. (2021). Microbial communities of titanium versus zirconia abutments on implant-supported restorations: Biodiversity composition and its impact on clinical parameters over a 3-year longitudinal prospective study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 23(2), 197–207. <https://doi.org/10.1111/cid.12978>
- Freitas, A. R., Silva, T. S. de O., Ribeiro, R. F., de Albuquerque Junior, R. F., Pedrazzi, V., & Do Nascimento, C. (2018). Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. *Clinical Oral Investigations*, 22(6), 2335–2343. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2334-0>
- Melo, F., do Nascimento, C., Souza, D. O., & de Albuquerque, R. F. (2017). Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. *Clinical Oral Implants Research*, 28(6), 697–703. <https://doi.org/10.1111/clr.12865>
- Desch, A., Freifrau von Maltzahn, N., Stumpp, N., Dalton, M., Yang, I., & Stiesch, M. (2020). Biofilm formation on zirconia and titanium over time—An in vivo model study. *Clinical Oral Implants Research*, 31(9), 865–880. <https://doi.org/10.1111/clr.13632>
- 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>
- Duan, X., Wu, T., Xu, X., Chen, D., Mo, A., Lei, Y., Cheng, L., Man, Y., Zhou, X., Wang, Y., & Yuan, Q. (2017). Smoking May Lead to Marginal Bone Loss Around Non-Submerged Implants During Bone Healing by Altering Salivary Microbiome: A

- Prospective Study. *Journal of Periodontology*, 88(12), 1297–1308. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.160808>
- Ferenc, K., Kinga, B., Kinga, K., & Zsolt, N. (2019). Changes in the “classical” factors influencing dental implant-osseointegration in recent decades. *Orvosi Hetilap*, 160(37), 1455–1463. <https://doi.org/10.1556/650.2019.31503>
- Frédéric, L. J., Michel, B., & Selena, T. (2018). Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials*, 11(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>
- French, D., Grandin, H. M., & Ofec, R. (2019). Retrospective cohort study of 4,591 dental implants: Analysis of risk indicators for bone loss and prevalence of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Journal of Periodontology*, 90(7), 691–700. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0236>
- G. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman, K., L. Mealey, B., Papapanou, P. N., Sanz, M., & S. Tonetti, M. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>
- Gao, X., Zhou, J., Sun, X., Li, X., & Zhou, Y. (2018). Diversity analysis of subgingival microbial bacteria in peri-implantitis in Uygur population. *Medicine*, 97(5), e9774. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009774>
- 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>
- Gu, W., Miller, S., & Chiu, C. Y. (2019). Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *HHS PUBLIC ACCESS*, 14, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751>.
- Ilyas, M. (2018). Next-Generation Sequencing in Diagnostic Pathology. *Pathobiology*, 84(6), 292–305. <https://doi.org/10.1159/000480089>
- Jenny, G., Jauernik, J., Bierbaum, S., Bigler, M., Grätz, K. W., Rücker, M., & Stadlinger, B. (2016). A systematic review and meta-analysis on the influence of biological implant surface coatings on periimplant bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(11), 2898–2910.

<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35805>

- Jo, J. H., Kennedy, E. A., & Kong, H. H. (2016). Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(3), e23–e27. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.005>
- 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, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596490>
- Kommerein, N., Doll, K., Stumpp, N. S., & Stiesch, M. (2018). Development and characterization of an oral multispecies biofilm implant flow chamber model. *PLoS ONE*, 13(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196967>
- Kröger, A., Hülsmann, C., Fickl, S., Spinell, T., Hüttig, F., Kaufmann, F., Heimbach, A., Hoffmann, P., Enkling, N., Renvert, S., Schwarz, F., Demmer, R. T., Papapanou, P. N., Jepsen, S., & Kerschull, M. (2018). The severity of human peri-implantitis lesions correlates with the level of submucosal microbial dysbiosis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(12), 1498–1509. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13023>
- Nie, J., Zhang, Q., Zheng, H., Xu, L.-X., Wang, X.-Y., & Chen, F. (2020). Pyrosequencing of the subgingival microbiome in peri-implantitis after non-surgical mechanical debridement therapy. *Journal of Periodontal Research*, 55(2), 238–246. <https://doi.org/10.1111/jre.12708>
- 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. *Journal of Periodontology*, 89, S304–S312. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0588>
- Rubino, C. V., Katz, B. G., Langlois, K., Wang, H. H., Carrion, J. A., Walker, S. G., Collier, J. L., Iacono, V. J., & Myneni, S. R. (2021). Evaluation of different materials used for sealing of implant abutment access channel and the peri-implant sulcus microbiota: A 6-month, randomized controlled trial. *Clinical Oral Implants Research*, 32(8), 941–950. <https://doi.org/10.1111/clr.13787>
- Salvi, G. E., Cosgarea, R., & Sculean, A. (2017). Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. *Journal of Dental Research*, 96(1), 31–37.

- <https://doi.org/10.1177/0022034516667484>
- Sanz-Martin, I., Doolittle-Hall, J., Teles, R., Patel, M., Belibasakis, G., Hämmerle, C., RE, J., & Teles, F. (2017). Exploring the microbiome of healthy and diseased peri-implant sites using Illumina Sequencing. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Schlaberg, R., Chiu, C. Y., Miller, S., Procop, G. W., & Weinstock, G. (2017). Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(6), 776–786. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0539-RA>
- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018a). Peri-implantitis. *Journal of Periodontology*, 89, S267–S290. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>
- Shahi, S. K., Zarei, K., Guseva, N. V, & Mangalam, A. K. (2020). Microbiota Analysis Using Two-step PCR and Next-generation 16S rRNA Gene Sequencing. *HHS PUBLIC ACCESS*, 152, 1-21. <https://doi.org/10.3791/59980>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *HHS PUBLIC ACCESS*, 122(1), e59. <https://doi.org/doi:10.1002/cpmb.59>.
- Sousa, V., Nibali, L., Spratt, D., Dopico, J., Mardas, N., Petrie, A., & Donos, N. (2017). Peri-implant and periodontal microbiome diversity in aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Clinical Oral Implants Research*, 28(5), 558–570. <https://doi.org/10.1111/clr.12834>
- Tamrakar, A. K., Murali, G., Singh, S., & Shakila, R. (2020). Evaluation of subgingival microbiota around single tooth implants. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 10(2), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2020.03.012>
- Vankov, P. Y., Ziganshina, E. E., Ilinskaya, O. N., Khafizova, F. A., Khafizov, R. G., & Ziganshin, A. M. (2016). Comparative Analysis of Bacterial Communities Associated with Healthy and Inflamed Peri-implant Tissues. *BioNanoScience*, 6(4), 490–495. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0270-5>
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525–540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>

- Wang, C. W., Hao, Y., Gianfilippo, R. Di, Sugai, J., Li, J., Gong, W., Kornman, K. S., Wang, H. L., Kamada, N., Xie, Y., Giannobile, W. V., & Lei, Y. L. (2021). Machine learning-Assisted immune profiling stratifies peri-implantitis patients with unique microbial colonization and clinical outcomes. *Theranostics*, *11*(14), 6703–6716. <https://doi.org/10.7150/thno.57775>
- Yu, X.-L., Chan, Y., Zhuang, L., Lai, H.-C., 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>