



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE



Caracterização do perfil microbiano de implantes restaurados com pilares de titânio ou zircônia: avaliação por sequenciamento do gene 16S rDNA

Trabalho de Conclusão de Curso-2019

Acadêmica: Francislaine de Cassia Talita Mantuan

Orientador: Prof. Dr. Cássio do Nascimento

Instituição Sede:

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular

Agências Financiadoras:

- 1) CNPq Chamada Universal Processo 457941/2014-6 (Vigência: 24/11/14 a 27/11/17)
- 2) Auxílio Regular Pesquisa FAPESP Processo 2014/22876-8 (Vigência: 01/07/16 a 30/06/2018)
- 3) Programa Unificado de Bolsas de Estudo - USP (Projeto 1992 - Benefício 83-1; Oferecimento 2017)

2019
Ribeirão Preto

RESUMO

Devido à crescente utilização de componentes cerâmicos como estruturas de suporte para restaurações sobre implantes e a ausência de resultados conclusivos, em longo prazo, sobre a influência deste tipo de material no processo de formação e manutenção do biofilme oral e saúde dos tecidos peri-implantares, este estudo teve por objetivo investigar o perfil microbiano do biofilme formado sobre próteses unitárias de implantes com conectores de zircônia (Zr) ou titânio (Ti) ao longo de 3 anos de função. Vinte indivíduos saudáveis que foram reabilitados com implantes dentários e coroas protéticas unitárias cimentadas sobre conectores de zircônia (n=10; região anterior de maxila) ou conectores de titânio (n=10; região posterior da mandíbula) foram selecionados para o estudo. Realizou-se a coleta de amostras de biofilmes supra e subgingival dos sítios peri-implantares e dentes contralaterais em 4 períodos distintos, na instalação da prótese (T0) e após 12 (T1), 24 (T2) e 36 (T3) meses de função mastigatória. A caracterização do perfil microbiano foi realizada por meio do sequenciamento do gene bacteriano 16S rDNA-based PCR, distinguindo a presença de diferentes filos, gêneros e espécies no biofilme microbiano. O sequenciamento apontou 458 diferentes tipos de espécies bacterianas de 9 filos distintos nos biofilmes investigados, dos quais 14,7% representam espécies ainda não classificadas. O perfil microbiano observado nas amostras supra e subgingivais das restaurações sobre implantes foi similar àquela encontrada nos dentes contra-laterais. Espécies patogênicas e não-patogênicas dos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Veillonella* e *Streptococcus* foram detectadas colonizando os sulcos peri-implantares das restaurações cimentadas dos dois tipos de conectores utilizados. Um maior número de espécies não classificadas foi encontrado no grupo titânio. De modo geral, pode-se concluir que o perfil microbiano do biofilme formado sobre restaurações cimentadas em conectores de titânio ou zircônia é similar ao

biofilme dos dentes remanescentes, com um aumento da quantificação das espécies ao longo do tempo. Os resultados sugerem uma adesão seletiva de algumas espécies em superfícies de titânio ou zircônia.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	5
2- PROPOSIÇÃO	8
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Delineamento experimental	
3.2. Cirurgia para colocação dos implantes e instalação das próteses	
3.3. Avaliação microbiológica	
3.3.1 Procedimentos de coleta de biofilme supragengival e subgengival	
3.3.2 Processamento biológico pelo sequenciamento de genes 16S rDNA-based PCR	
4- RESULTADO	13
5- DISCUSSÃO	19
6- CONCLUSÃO.....	22
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1.Introdução

O emprego de implantes dentais osseointegrados na prática odontológica tem sido extensivamente relatado na literatura desde seu surgimento e apresenta um alto índice de sucesso clínico quando corretamente indicado e empregado (Bränemark et al., 1985; Albrektsson et al., 1988; Hruska et al., 2002; Busenlechner et al., 2014; Urban et al., 2016).

Estudos têm demonstrado, entretanto, que diversos micro-organismos presentes na cavidade oral, em especial os relacionados à doença periodontal, constituem os principais responsáveis pelos maiores índices de insucesso dos implantes em longo prazo, além de fatores oclusais desfavoráveis (Chrcanovic et al., 2014; Esquivel-Upshaw et al., 2014; Testori et al., 2016). A presença de bactérias periodonto-patogênicas nos sulcos peri-implantares e a presença de dentes com periodontite próximos a implantes dentais são considerados fatores de risco para o sucesso dos implantes (Saito et al., 1997; Jervøe-Storm et al. 2014; Hamada et al., 2016).

Sistemas de implantes de dois componentes, Bränemark-compatíveis, embora sejam os mais estudados e utilizados, inevitavelmente apresentam espaços entre o implante e o conector transmucoso (conector protético), os quais servem de abrigo para micro-organismos potencialmente capazes de provocar reações inflamatórias nos tecidos peri-implantares (do Nascimento et al., 2011; do Nascimento et al., 2012; Pita et al., 2016; do Nascimento et al., 2016). Na maioria desses sistemas, a plataforma do implante é posicionada ao nível da crista alveolar, o que expõe o tecido ósseo adjacente ao risco de uma contaminação/infecção microbiana (Welander et al. 2008). A reabsorção óssea ao redor dos implantes relacionada à colonização de espécies periodonto-patogênicas foi descrita recentemente (Jervøe-Storm et al., 2014; Hamada et al., 2016).

A conexão dos tecidos moles ao redor dos implantes atua como uma barreira de proteção entre o ambiente da cavidade oral e o tecido ósseo peri-implantar (Welander et al. 2008). O material do conector protético parece ter um papel importante na adesão de micro-organismos e, conseqüentemente, na qualidade final da união entre a mucosa e a superfície do conector (Abrahamsson et al. 1997). Metais preciosos, metais básicos e zircônia têm sido relatados para a fabricação de conectores protéticos (Abrahamsson et al. 1997, do Nascimento et al. 2016). Os conectores de titânio são os mais utilizados e descritos na literatura. A interface entre a mucosa peri-implantar e os conectores feitos de titânio é composta de um tecido epitelial e conectivo (Abrahamsson et al. 1997). A estrutura e a função desta barreira foram previamente descritas por diversos estudos, com resultados satisfatórios com relação à biocompatibilidade, resistênica mecânica e à corrosão do metal (Welander et al. 2008; van Brakel et al. 2012). Entretanto, o potencial citotóxico celular relacionado à liberação de nanopartículas do metal e, principalmente, a alta implicação estética de restaurações anteriores levou ao surgimento de materiais alternativos aos metais para a confecção dos conectores protéticos (van Brakel et al. 2012). Em particular, materiais cerâmicos, como a zircônia, têm ganhado popularidade pela semelhança de cor com as estruturas dentais e potenciais vantagens biológicas, o que tem difundido sua utilização nas restaurações anteriores com grande demanda de estética. Conectores feitos em material cerâmico têm sido largamente utilizados na região anterior da maxila com resultados estéticos superiores aos obtidos com conectores de titânio (Brodbeck 2003, Watkin e Kerstein 2008) e menor adesão de micro-organismos (do Nascimento et al. 2013, 2016). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram um baixo risco de fratura destes materiais (Glauser et al 2003, Gehrke et al 2006).

Apesar da crescente utilização de conectores cerâmicos e a altas taxas de sucesso relacionadas ao fator estético, existem poucos estudos e não há resultados conclusivos

mostrando que conectores fabricados em zircônia apresentam um melhor comportamento na manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares em longo prazo (Linkevivius e Apce, 2008; de Medeiros et al., 2013). Poucos estudos procuraram monitorar e relacionar o perfil microbiano formado sobre os componentes cerâmicos com os parâmetros clínicos dos implantes após vários anos de função. Alguns achados recentes da literatura permitem uma avaliação prévia do possível impacto destes materiais em um curto período de tempo. Resultados preliminares de estudos em animais (Abrahansson et al., 1998) e cultura de células (Nothdurft et al., 2014) indicaram que os conectores fabricados em zircônia podem ter um efeito favorável na saúde dos tecidos peri-implantares quando comparados aos conectores de titânio. Neste mesmo contexto, um estudo clínico recente mostrou uma diferença significativa no perfil microbiano formado ao redor de conectores de titânio ou zircônia após um período de 6 meses de função, com uma maior quantidade e variabilidade de micro-organismos colonizando os componentes de titânio, sugerindo um potencial fator relacionado à maior reabsorção marginal óssea encontrada neste material.

A busca por novos materiais e técnicas que reduzam esta colonização é frequentemente reportada na literatura. Estudos *in vitro* e dados preliminares de pesquisas clínicas, sugerem que componentes cerâmicos podem reduzir a formação do biofilme microbiano e consequente extensão da inflamação dos tecidos peri-implantares.

2. Proposição

O objetivo deste estudo foi caracterizar, por meio do sequenciamento do gene 16S DNA-based PCR, a diversidade microbiana dos sulcos peri-implantares e restaurações protéticas cimentadas sobre conectores de titânio e zircônia após 12, 24 e 36 meses de função.

3. Material e Método

3.1. Delineamento experimental

Foram selecionados 20 indivíduos (n=20) que receberam um sistema de implantes de dois estágios cirúrgicos na região anterior da maxila ou na região posterior da maxila/mandíbula (de acordo com o conector protético selecionado) e que seguiam os seguintes critérios de inclusão: (a) idade acima de 18 anos; (b) ausência de profilaxia nos 3 meses prévios ao início do estudo; (c) presença de dente antagonista e contralateral; (d) indicação de prótese unitária cimentada sobre implante.

Na fase de recrutamento foram incluídas pessoas de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, com boas condições gerais de saúde, presença de espaço protético unitário na região anterior da maxila ou região posterior da mandíbula com indicação para reabilitação com implante, presença de dente antagonista e contralateral à região do implante, ausência de manifestações bucais de doenças sistêmicas ou processos infecciosos agudos na cavidade oral. Os critérios de exclusão foram: gravidez, lactação, tratamento periodontal ou com antibiótico nos últimos três meses, presença de qualquer condição sistêmica que possa influenciar na evolução da doença periodontal ou que exija pré-medicação para realização de procedimentos odontológicos, uso de tabaco e presença de gengivite ou periodontite. Orientações foram dadas quanto aos procedimentos da pesquisa, e aos voluntários foi novamente facultado o direito de decidir sobre sua participação ou não nesta segunda fase do estudo. Este estudo foi realizado com a devida apreciação e aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CAAE 0066.0.138.000-10) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2. Cirurgia para colocação dos implantes e instalação das próteses

Todos os participantes recrutados foram reabilitados com implantes de conexão do tipo cone morse com plataforma de Ø 3,5 mm (Ankylos C/X, Dentsply Friadent). Dez indivíduos receberam os implantes na região anterior da maxila; neste grupo, as restaurações protéticas foram cimentadas sobre os conectores protéticos de zircônia (Cercon Balance C/ reto, Ankylos). Os outros 10 indivíduos receberam os implantes na região posterior da maxila ou mandíbula, e as restaurações foram cimentadas sobre co-

nectores protéticos de titânio (Balance posterior C/ reto, Ankylos). Todos os conectores utilizados eram usinados de fábrica, e não sofreram qualquer tipo de tratamento ou acabamento superficial.

3.3. Avaliação microbiológica

3.3.1. Procedimento de coleta do biofilme supra e subgingival

Para coleta do biofilme supragingival e subgingival, as próteses sobre implantes e os dentes contralaterais foram previamente isolados com roletes de algodão, para minimizar a contaminação das amostras com a saliva. Amostras do biofilme supragingival foram colhidas de toda a superfície externa das coroas protéticas e coroas dos dentes contralaterais, com o auxílio de uma escova do tipo microbrush. Amostras do biofilme subgingival foram coletadas com o auxílio de 6 cones de papel esterilizados (tamanho 30, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), sendo 3 cones inseridos na parte mais apical do sulco vestibular e 3 cones no sulco lingual/palatino, nas regiões mesial, central e distal das coroas (BELIBASAKIS; SCHMIDLIN; SAHRMANN, 2014). Os cones de papel permaneceram no sulco por 30 segundos e, ao final da coleta, foram colocados em um mesmo microtubo constituindo uma única amostra por elemento. Amostras do biofilme dos sulcos periodontais dos dentes contralaterais também foram colhidas seguindo o mesmo protocolo. As amostras coletadas foram transferidas para microtubos individuais identificados e contendo 150µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6), aos quais foram adicionados 150µL de NaOH 0,5M o que permitiu a lise e a suspensão do DNA na solução. Todos os microtubos foram armazenados em temperatura de -20°C até o processamento.

3.3.2. Processamento microbiológico pelo Sequenciamento do gene 16S rDNA based PCR

O processamento das amostras pela técnica do sequenciamento do gene 16S foi realizada parte em nosso Laboratório, e parte no Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. A extração do DNA das amostras clínicas foi realizada utilizando-se CTAB (1.4 M NaCl, 100 mM

Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB), clorofórmio:álcool isoamílico CIA (24:1), isopropanol e etanol. Todas as amostras foram amplificadas pela técnica do 16S rDNA-based PCR para posterior avaliação por sequenciamento do 16S DNA ribossômico (rDNA), sequência bastante utilizada na identificação genética de bactérias. As reações incluíram 2 µL de DNA extraído (5 ng), ao qual foram adicionados 2,5 µL de 10X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 0,5 µL de MgSO₄ 50 mM; 0,5 µL de 10 mM dNTP mix (Invitrogen); 0,5 µL de primer *reverse* 10 µM; 0,5 µL de primer *forward* 10 µM e 0,1 µL de Taq polimerase (Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, 5U/µL). O volume final de cada microtubo foi completado até 25 µL com água ultra pura (Nuclease-Free Water, ThermoFisher Scientific). Todas as amostras amplificadas, produtos da reação de PCR, foram submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Sigma) para verificação da integridade de sua estrutura e determinação do peso molecular. Após a amplificação, as amostras foram purificadas pelo método de *beads* magnéticas (AMPure XP Beads).

Preparo das bibliotecas e amplificação por PCR em emulsão: Esta etapa teve o objetivo de incluir barcodes específicos para cada biblioteca proposta. No total, foram preparadas 12 bibliotecas para cada tipo de conector (zircônia e titânio), perfazendo um total de 24 bibliotecas, conforme tabela 1 (24 diferentes combinações de Index). A combinação de 5 µL de primers Index 1 (N701 – N712) e primers Index 2 (S501 – S504) (Kit index Nextera XT) contendo sequências de adaptadores específicas foram distribuídos em uma placa de 96 poços para PCR. Em seguida, foram distribuídos nos poços da placa 5 µL de cada amostra 25 µL 2x KAPA Hifi HOTstart READ mix e 10 µL de água, perfazendo um total de 50 µL em cada poço. Após homogeneização em centrifuga (1000g, 1 minuto e 20°C) foram realizados 8 ciclos por reação utilizando um termociclador e respeitando as seguintes condições: etapa de desnaturação de 30 segun-

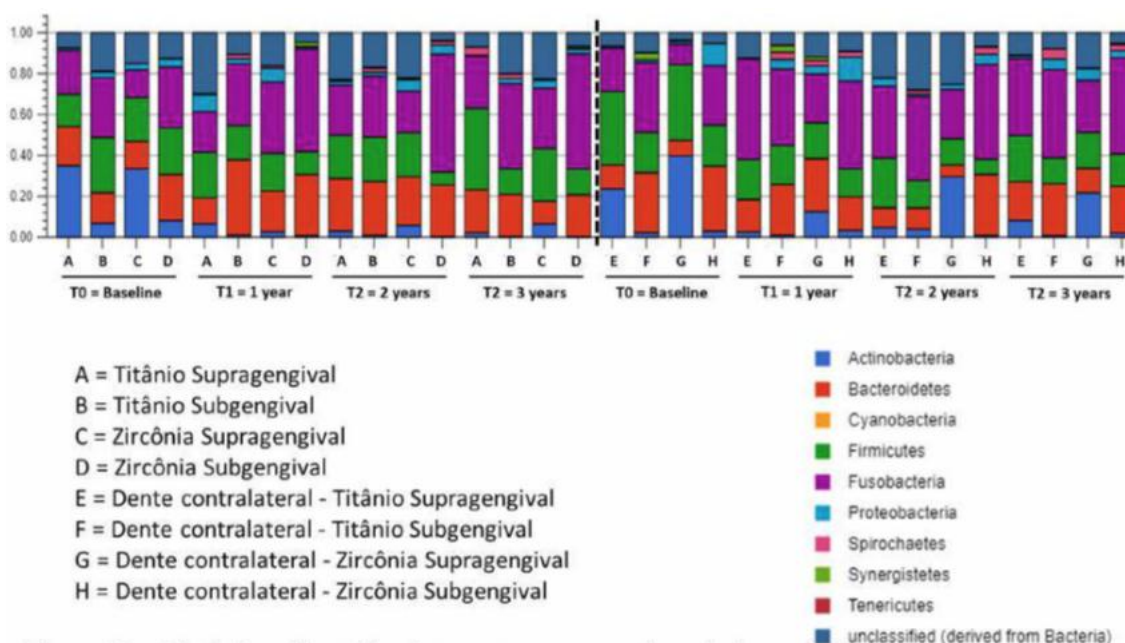
dos a 95°C, etapa de anelamento de 30 segundos a 55°C e etapa de extensão de 30 segundos a 72°C. Os produtos de amplificação (amplicons) foram purificados pelo método de beads magnéticas (AMPure XP Beads) de forma semelhante ao protocolo descrito anteriormente.

Sequenciamento das bibliotecas: O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma MiSeq Illumina®. Inicialmente, um volume de 5µL de cada biblioteca (pool 4nM) foi desnaturado com NaOH (0,2 N), seguido por uma diluição até se obter a concentração final de 10 pM. 570µL de cada biblioteca desnaturada e diluída foram adicionados a 30µL de PhiX controle desnaturado e diluído, e incubados a 96°C por 2 minutos. Após a incubação, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo por 5 minutos. Na sequência, foram transferidos para uma lâmina de fluxo para a realização do sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina®. As leituras (reads) obtidas foram pareadas utilizando a plataforma UseGalaxy® (AFGAN et al., 2016) e o seu comprimento final foi ajustado para o tamanho padrão de 165 bp, conforme recomendação do protocolo Illumina. A análise de todas as sequências foi realizada por meio do servidor Metagenomics RAST (MG-Rast versão 3), que permite a análise filogenética e funcional dos metagenomas obtidos utilizando diversas bases de dados (ITS, Greengenes, Silva LSU, M5RNA, RDP e Silva SSU). As bibliotecas foram agrupadas em filotipos com um mínimo de similaridade de 98% (Parâmetros: minimum cutoff 98%, maximum e-value 1×10^{-5} , minimum alignment length cutoff 165bp).

4. Resultados

Um total de 248 amostras de biofilmes foram coletadas dos diversos sítios dos participantes (80 amostras no baseline e 56 amostras nos demais tempos). Aproximadamente 4,89 milhões de sequências de gene 16S foram obtidas e classificadas em diferentes unidades taxonômicas operacionais, das quais 720.891 (14,74%) sequências se enquadraram como “não classificadas”, ou seja, espécies de bactérias ainda não cultiváveis. No geral, as sequências identificadas representaram 9 diferentes filos, 20 classes, 42 ordens, 75 famílias, 121 gêneros e 458 espécies. De uma forma geral, pôde-se observar uma distribuição filogenética semelhante entre os conectores protéticos investigados e os dentes contralaterais usados como controles (Figura 1), com maior prevalência média dos filos Fusobacteria (37,15%), Bacteroidetes (20,20%) e Firmicutes (17,53%).

Figura 1 - Distribuição filogenética das amostras supra e subgingivais associadas a implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contra-laterais (controle).



As Figuras 2 e 3 ilustram a evolução do perfil microbiano, em nível de gênero, em amostras supra e subgingivais associadas a implantes com restaurações unitárias

cimentadas sobre os conectores protéticos de titânio ou zircônia e seus respectivos dentes contra-laterais (controle), onde pode-se observar algumas diferenças entre os grupos investigados (titânio e zircônia) e seus controles (dentes contralaterais). Para ambos os grupos, uma maior prevalência dos gêneros *Fusobacterium* e *Porphyromonas* foi observado nas amostras subgingivais e peri-implantares, enquanto os gêneros *Veillonella* e *Leptotrichia* foram mais prevalentes nas amostras supragingivais. Os gêneros *Actinobacillus*, *Bacteroidetes* e *Butyrivibrio* foram encontrados relacionados apenas ao titânio e os gêneros *Bulleidia*, *Micobacterium* e *Nitrobacter* apenas na zircônia. De destaque, o grupo zircônia (Zr: 47,33%) apresentou maior prevalência do gênero *Fusobacterium* em relação aos demais grupos investigados (Ti: 30,04%; Controle Ti: 34,61%; Controle Zr: 34,51%).

Figura 2 - Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras supragingivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contra-laterais (controle). T0= baseline; T1= 1 ano após instalação da prótese; T2= 2 anos após instalação da prótese e T3 = 3 anos após instalação da prótese.

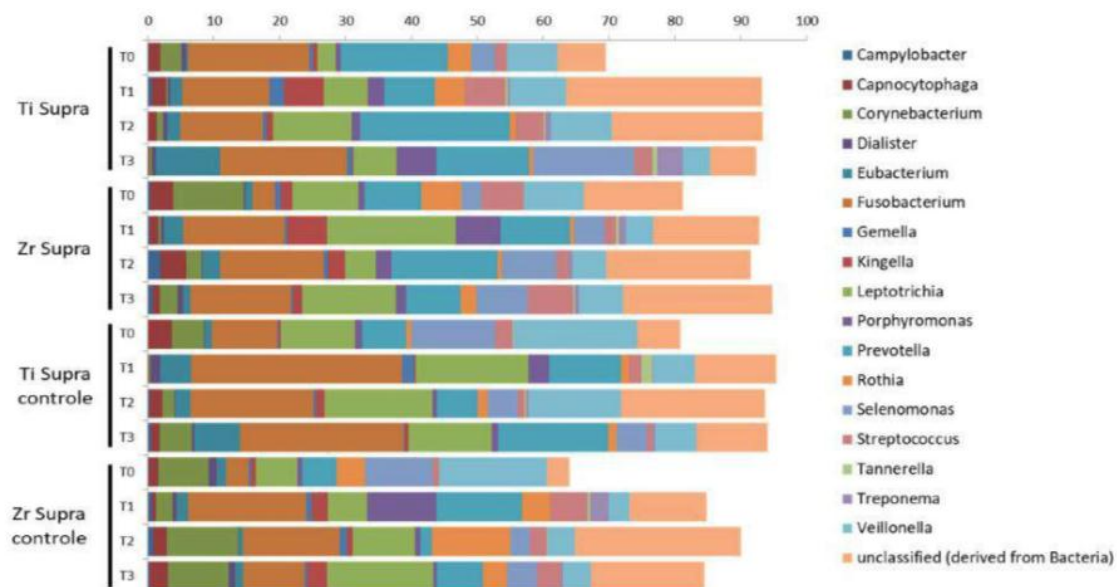
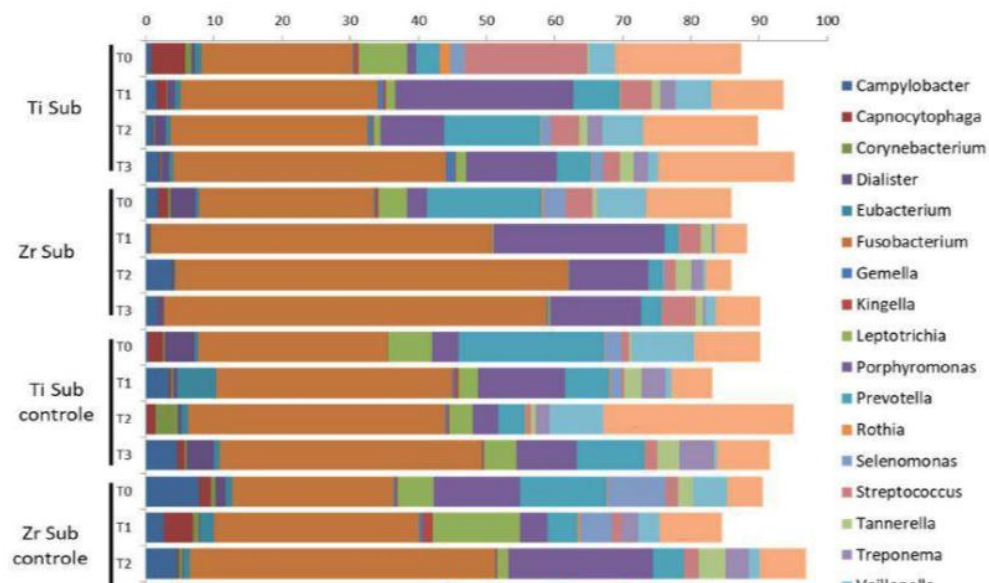


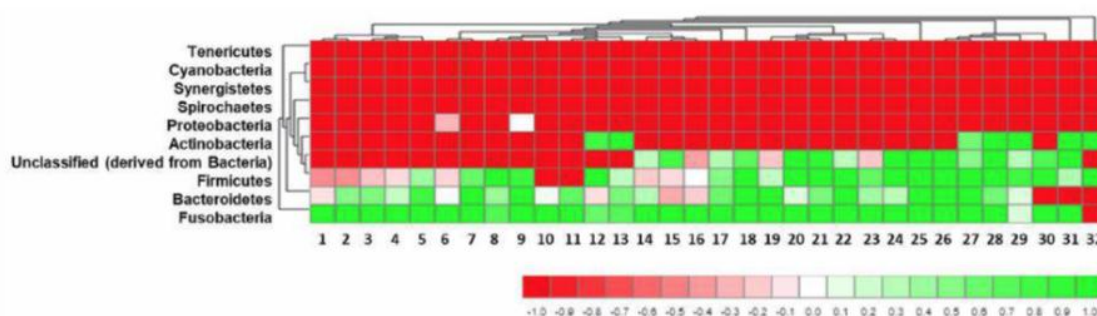
Figura 3- Ilustração gráfica da evolução do perfil microbiano ao longo do tempo, em nível de gênero, nas amostras subgingivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contra-laterais (controle). T0= baseline; T1= 1 ano após instalação da prótese; T2= 2 anos após instalação da



prótese e T3 = 3 anos após instalação.

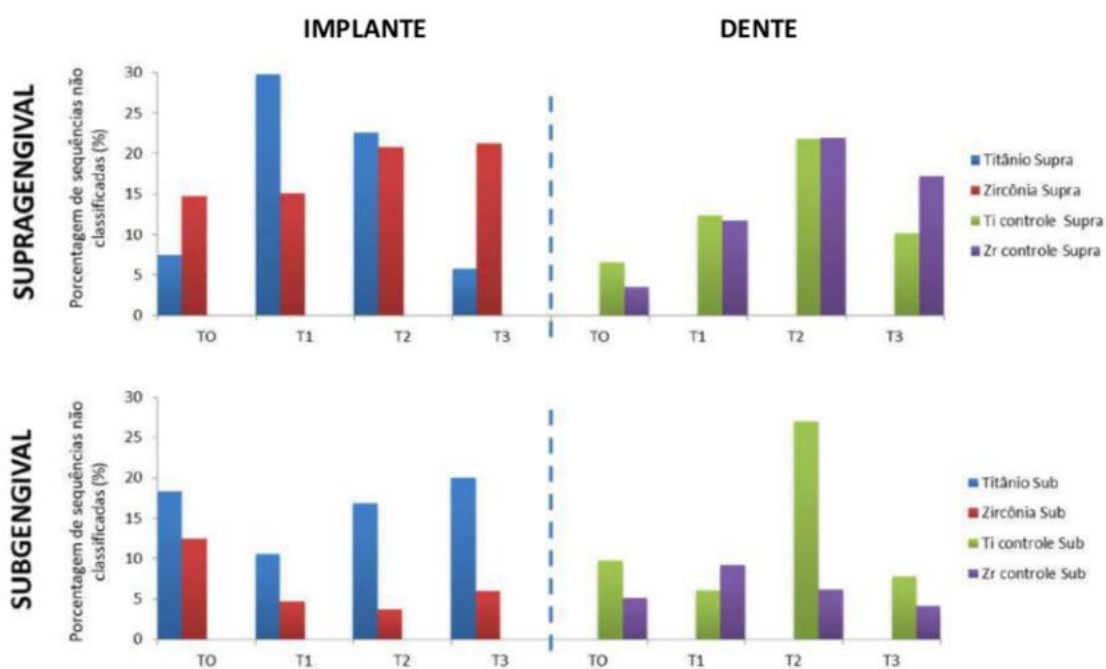
A Figura 4 ilustra o perfil geral dos dendrogramas gerados e um heat-map representando as micro-abundâncias das sequências obtidas em cada biblioteca em nível de filo. Observa-se que as espécies pertencentes ao filo Fusobacterium foram encontradas em grandes proporções em praticamente todas as bibliotecas avaliadas, seguidos pelos filios Bacteroidetes e Firmicutes. Nota-se, uma abundância relevante de espécies ainda não-classificadas tanto para os sítios associados aos conectores de titânio quanto aos de zircônia.

Figura 4 - Gráfico do tipo heat-map mostrando as microbiabiundâncias dentro do conjunto de dados de sequenciamento do gene 16S rDNA em nível de filo (1: Zircônia subgingival T3; 2: Zircônia subgingival T1; 3: Titânio controle subgingival T3; 4: Zircônia controle subgingival T3; 5: Titânio controle subgingival T1; 6: Zircônia controle subgingival T1; 7: Titânio controle subgingival T0; 8: Titânio supragengival T3; 9: Zircônia controle subgingival T0; 10: Zircônia subgingival T2; 11: Zircônia controle subgingival T2; 12: Titânio controle supragengival T0; 13: Titânio supragengival T0; 14: Titânio subgingival T3; 15: Titânio controle subgingival T2; 16: Titânio controle supragengival T1; 17: Zircônia supragengival T1; 18: Titânio subgingival T2; 19: Titânio subgingival T1; 20: Zircônia supragengival T3; 21: Titânio subgingival T0; 22: Zircônia subgingival T0; 23: Titânio controle supragengival T3; 24: Titânio supragengival T1; 25: Titânio supragengival T2; 26: Zircônia supragengival T2; 27: Zircônia controle supragengival T1; 28: Zircônia controle supragengival T3; 29: Titânio supragengival T0; 30: Titânio controle supragengival T2; 31: Zircônia controle supragengival T2; 32: Titânio controle supragengival T0).



Na Figura 5, estão representadas as porcentagens das leituras de seqüências das espécies bacterianas enquadradas como “não classificadas”, em amostras supra ou subgingival relacionadas com implantes ou dentes. As amostras sub e supragengivais dos dentes contra-laterais apresentaram porcentagens semelhantes de seqüências “não- classificadas” em praticamente todos os tempos investigados. Diferentemente, nas amostras relacionadas aos implantes, maiores porcentagens de seqüências “não classificadas” foram encontradas em amostras associadas aos conectores de titânio, tanto no biofilme supragengival (29,85% no tempo T1) quanto no biofilme subgingival (20,02% no tempo T3). A porcentagem média ds seqüências “não classificadas”, considerando-se todos os tempos investigados nas amostras subgingivais, foi de 16,44% para o grupo titânio e 6,69% para o grupo zircônia.

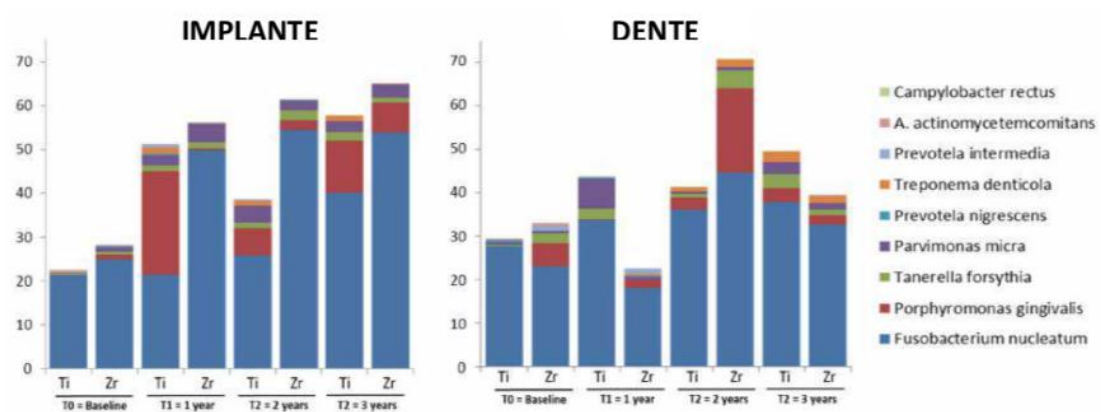
Figura 5 - Porcentagem de sequências “não classificadas” em amostras supra e subgingivais associadas aos implantes com conectores de titânio ou zircônia e dentes contra-laterais (controle). T0= baseline; T1= 1 ano após instalação da prótese; T2= 2 anos após instalação da prótese e T3 = 3 anos após instalação da prótese.



Ambos conectores apresentaram diversidades semelhantes de bactérias peri-
donto-patogênicas, mas a proporção de algumas espécies variou de acordo com o sub-
strato. A Figura 6 ilustra a abundância relativa das espécies em cada substrato. Por-
phyromonas gingivalis foi mais prevalente nas amostras do grupo titânio à partir de 1
ano de função, com porcentagem média de 10,48%. Para o grupo zircônia, a porcenta-
gem média foi de 2,58%. De modo contrário, a espécie Fusobacterium nucleatum foi
mais prevalente nas amostras do grupo zircônia em todos os tempos analisados (média
45,81%) em relação ao grupo titânio (27,16%). Diferentemente, nos grupos controles
ocorre uma inversão, Fusobacterium nucleatum é mais prevalente no grupo titânio
(33,77%) e Porphyromonas gingivalis no grupo zircônia (7,19%). Treponema denticola

e *Prevotella intermedia* foram observadas com menor prevalência no grupo zircônia em relação aos grupos controles e titânio. Outras espécies patogênicas, como *Tanerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* e *Campylobacter rectus* foram observadas em todos os grupos, com distribuição semelhante e porcentagem média inferior a 3%.

Figura 6 - Abundância relativa (%) das espécies periodonto-patogênicas ao longo do tempo associadas ao biofilme subgingival em implantes com restaurações protéticas unitárias sobre conectores de titânio ou zircônia, e dentes contra-laterais, ao longo de 3 anos de função.



5. Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar, por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA-based PCR, a microbiota formada ao redor de restaurações unitárias de implantes cimentadas sobre conectores de titânio ou zircônia. O propósito foi comparar qualitativamente o biofilme formado desde a instalação das próteses até um período de função de 3 anos. Embora alguns estudos tenham observado similaridades entre a microbiota associada a dentes remanescentes e implantes (SCHAUMANN et al., 2014; STOKMAN et al., 2017), ainda há uma escassez muito grande de resultados conclusivos, principalmente em longo prazo, sobre o comportamento do perfil microbiano das comunidades peri-implantares associados aos diferentes conectores testados.

Os resultados microbiológicos qualitativos revelaram diferenças relevantes entre os conectores de titânio e zircônia ao longo do tempo. Os resultados, obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rDNA-based PCR, sugerem uma colonização seletiva de algumas espécies bacterianas para cada tipo de substrato. Espécies periodontopatogênicas, caracterizadas por sua capacidade destrutiva comparada com outras bactérias da microbiota oral, foram encontradas nas amostras de todos os grupos. No entanto, algumas espécies mostraram-se mais seletivas para determinado substrato, como *F. nucleatum* para zircônia e *P. gingivalis* para o titânio. *P. gingivalis* pode induzir mucosite peri-implantar e peri-implantite (ZENG et al, 2015; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2016; AL-AHMAD et al., 2018) e *F. nucleatum*, que além de um patógeno necrosante relacionado à infecções peri-implantares (CANULLO et al., 2015) é também um patógeno que se coagrega com muitas espécies, aumentando, assim, a formação do biofilme patogênico. Alguns autores sugerem que rugosidade superficial é o fator que mais interfere na adesão microbiana em superfícies de titânio (LORENZETTI et al. 2015), enquanto outros estudos atribuíram a energia livre de superfície como fator mais impor-

tante na formação inicial do biofilme em superfícies de zircônia (HAHNEL et al. 2009; BURGERS et al. 2010). Recentemente, diferenças na capacidade de adesão bacteriana têm sido atribuídas às diferenças de potenciais eletrostáticos entre os micro-organismos e substratos (YU et al. 2016). Outro achado interessante do estudo, foi a detecção de uma abundância relativa significativa de espécies reportadas como “não-classificadas”. Um maior percentual destas espécies bacterianas foi encontrado em amostras associadas aos conectores de titânio (DO NASCIMENTO et al., 2017). Dentro do conhecimento atual da literatura, estes resultados sugerem que estas espécies podem ser mais influenciadas pelas características topográficas do substrato titânio. Alguns fatores, tais como barreira gengival, topografia de superfície, interações atômicas (geralmente relacionadas ao potencial eletrostático de cada substrato) e energia livre superfície podem ajudar na compreensão destas diferenças. Algumas bactérias periodonto-patogênicas, como *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que foram encontradas em menor proporção nos conectores de zircônia, podem destruir a barreira de proteção epitelial (NOGUCHI et al., 2003; ABE-YUTORI et al., 2017). Esses achados sugerem que a seletividade por determinadas espécies e diferenças no perfil microbiano observado em conectores de zircônia pode lhe conferir maior resistência a estímulos exógenos, por meio da manutenção de moléculas de adesão que confere fortes contatos intercelulares na barreira epitelial.

A literatura mostra que a colonização bacteriana atua como um importante fator responsável pela perda do implante após a osseointegração (PYE et al., 2009). Os estudos atualmente disponíveis sobre a composição microbiana ao redor de implantes saudáveis e com peri-implantite mostram resultados controversos (LAFURIE et al., 2017). Revisões sistemáticas recentes investigaram a composição microbiana em sítios com implantes saudáveis, peri-implantite e doença periodontal (PEREZ-CHAPARRO

et al., 2016; RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2017; LAFAURIE et al., 2017). Os resultados indicam que implantes saudáveis e com peri-implantite são colonizados por micro-organismos periodonto-patogênicos (LAFAURIE et al., 2017). Além disso, a peri-implantite é caracterizada pela colonização de bacilos Gram-positivos anaeróbios assacarolíticos não-cultiváveis e bacilos Gram-negativos anaeróbios não cultiváveis (LAFAURIE et al., 2017). Neste estudo, não houve predileção de espécies Gram-positivas ou Gram-negativas por algum dos substratos investigados.

Os achados deste estudo são de relevância clínica, uma vez que espécies patogênicas e não-patogênicas foram detectadas colonizando os diversos sítios experimentais; além de que algumas espécies microbianas sugerem uma colonização seletiva para um determinado tipo de conector. Os resultados apresentados no presente estudo trazem informações que podem ser consideradas relevantes e complementam aquelas já discutidas por investigações que abordam o mesmo tema. Os resultados descritos mostram que a microbiota peri-implantar pode sofrer alterações substanciais ao longo do tempo influenciada pelos substratos utilizados para a confecção dos componentes protéticos.

6. CONCLUSÕES

De acordo com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que os conectores de titânio e zircônia apresentaram diferenças no perfil microbiano, com alterações ao longo dos 3 anos de investigação, sugerindo uma adesão seletiva dos micro-organismos em função do tempo e substrato. Os sítios relacionados aos conectores de titânio apresentaram uma maior prevalência de espécies “não classificadas”.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE-YUTORI, M.; CHIKAZAWA, T.; SHIBASAKI, K.; MURAKAMI, S. Decreased expression of E-cadherin by Porphyromonas gingivalis-lipopolysaccharide attenuates epithelial barrier function. J Periodontal Res, v. 52, n. 1, p. 42-50, 2017.

ABRAHAMSSON, I.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol, v. 24, n. 8, p. 568-572, 1998.

AKL, E.A.; BRIEL, M.; YOU, J.J.; LAMONTAGNE, F.; GANGJI, A.; CUKIERMANYAFFE, T.; ALSHURAF, M.; SUN, X.; NERENBERG, K.A.; JOHNSTON, S.C.; VERA, C.; MILLS, E.J.; BASSLER, D.; SALAZAR, A.; BHATNAGAR, N.; BUSSE, J.W.; KHALID, Z.; WALTER, S.D.; COOK, D.J.; SCHÜNEMANN, H.J.; ALTMAN, D.G.; GUYATT G.H. Lost to follow-up Information in Trials (LOST-IT): a protocol on the potential impact. Trials, v. 10, p. 1-40, 2009.

AL-AHMAD A, MUZAFFERiy F, ANDERSON AC, WÖLBER JP, RATKAKRÜGER P, FRETWURST T, NELSON K, VACH K3, HELLWIG E. Shift of microbial composition of peri-implantitis-associated oral biofilm as revealed by 16S rRNA gene cloning. J Med Microbiol, v. 67, n. 3, p. 332-340, 2018.

AL-AHMAD, A.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; FACKLER, A.; FOLLO, M.;HELLWIG, E.; BACHLE, M.; HANNIG, C.; HAN, J. S.; WOLKEWITZ,

M.; KOHAL, R. In vivo study of the initial bacterial adhesion on different implant materials. *Arch Oral Biol*, v. 58, n. 9, p. 1139-1147, 2013.

AL-AHMAD, A.; WIEDMANN-AL-AHMAD, M.; FAUST, J.; BACHLE, M.; FOLLO, M.; WOLKEWITZ, M.; HANNIG, C.; HELLWIG, E.; CARVALHO, C.; KOHAL, R. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 95, n. 1, p. 101-109, 2010.

ALBORNOZ, A.C.; VIGNOLETTI, F.; FERRANTINO, L.C.; ARDENAS, E. de SANCTIS, M.; SANZ, M. A randomized trial on the aesthetic outcomes of implant-supported restorations with zirconia or titanium abutments. *J Clin Periodontol*, v. 41, n. 12, p. 1161-1169, 2014.

ALSHEHRI, M.; ALBAQIAH, H. Antimicrobial Efficacy of Materials Used for Sealing the Implant Abutment Screw Hole: An In Vitro Evaluation. *Implant Dent*, v. 26, n. 6, p. 911-914, 2017.

BELIBASAKIS, G. N.; SCHMIDLIN, P. R.; SAHRMANN, P. Molecular microbiological evaluation of subgingival biofilm sampling by paper point and curette. *APMIS*, v. 122, n. 4, p. 347-352, 2014.

BENGAZI, F.; WENNSTROM, J. L.; LEKHOLM, U. Recession of the soft tissue margin at oral implants. A 2-year longitudinal prospective study. *Clin Oral Implants Res*, v. 7, n. 4, p. 303-310, 1996.

BIDRA, A.S.; RUNGRUANGANUNT, P. Clinical outcomes of implant abutments in the anterior region: a systematic review. *J Esthet Restor Dent*, v. 25, n. 3, p. 159-76, 2013.

BOLLEN, C. M.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*, v. 7, n. 3, p. 201-211, 1996.

BORNSTEIN, M. M.; HORNER, K.; JACOBS, R. Use of cone beam computed tomography in implant dentistry: current concepts, indications and limitations for clinical practice and research. *Periodontol 2000*, v. 73, n. 1, p. 51-72, 2017.

BRÄGGER, U.; PASQUALI, L.; RYLANDER, H.; CARNES, D.; KORNMAN, K.S. Computer-assisted densitometric image analysis in periodontal radiography. *J Clin Periodontol*, v. 15, p. 27–37, 1998.

BRODBECK, U. The Zi Real Post: A new ceramic implant abutment. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. v. 15, p. 10-23, 2003.

BRUNNER, E.; LANGER, F. Non-parametric analysis of longitudinal data. 1st ed. Munich: Oldenburgverlag, 1999.

BURGERS, R.; HAHNEL, S.; REICHERT, T.E.; ROSENTRITT, M.; BEHR, M.; GERHARD, T.; HANDEL, G.; GOSAU, M. Adhesion of *Candida albicans* to various

dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomaterialia*. v. 6, p. 2307–2313, 2010.

CANULLO, L.; PENARROCHA-OLTRA, D.; COVANI, U.; ROSSETTI, P. H. Microbiologic and Clinical Findings of Implants in Healthy Condition and with Periimplantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 30, n. 4, p. 834-842, 2015.

CANULLO, L.; PENARROCHA, M.; MONJE, A.; CATENA, A.; WANG, H. L.; PENARROCHA, D. Association Between Clinical and Microbiologic Cluster Profiles and Peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 32, n. 5, p. 1054-1064, 2017.

CASSETTA M, DRIVER A, BRANDETTI G, CALASSO S. Peri-implant bone loss around platform-switched Morse taper connection implants: a prospective 60-month follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 45, n. 12, p. 1577-1585, 2016.

CHANG, M.; WENNSTROM, J. L. Peri-implant soft tissue and bone crest alterations at fixed dental prostheses: a 3-year prospective study. *Clin Oral Implants Res*, v. 21, n. 5, p. 527-534, 2010.

CHARALAMPAKIS, G.; BELIBASAKIS, G. N. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*, v. 6, n. 3, p. 183-187, 2015.

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L.; DEVILLE, S. low temperature degradation of zirconia and implications for biomedical implants. *Annual Rev Mater Res*, v. 37, p. 132, 2007.

COSYN, J.; VAN AELST, L.; COLLAERT, B.; PERSSON, G. R.; DE BRUYN, H. The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*, v. 13, n. 4, p. 286-295, 2011.

DE AVILA, E. D.; AVILA-CAMPOS, M. J.; VERGANI, C. E.; SPOLIDORIO, D. M.; MOLLO FDE, A., JR. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic bio-film on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*, v. 115, n. 4, p. 428-436, 2016.

DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; LIMA, B. P.; LUX, R.; SHI, W.; JUNIOR, M. J.; SPOLIDORIO, D. M.; VERGANI, C. E.; DE ASSIS MOLLO JUNIOR, F. Impact of Physical Chemical Characteristics of Abutment Implant Surfaces on Bacteria Adhesion. *J Oral Implantol*, v. 42, n. 2, p. 153-158, 2016.

DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; PALOMARI SPOLIDORIO, D. M.; DE ASSIS MOLLO, F., JR. Implications of Surface and Bulk Properties of Abutment Implants and Their Degradation in the Health of Periodontal Tissue. *Materials (Basel)*, v. 6, n. 12, p. 5951-5966, 2013.

DE AVILA, E. D.; DE MOLON, R. S.; VERGANI, C. E.; DE ASSIS MOLLO, F., JR.; SALIH, V. The Relationship between Biofilm and Physical-Chemical Properties of Im-

plant Abutment Materials for Successful Dental Implants. *Materials (Basel)*, v. 7, n. 5, p. 3651-3662, 2014.

DE AVILA, E. D.; VERGANI, C. E.; MOLLO JUNIOR, F. A.; JUNIOR, M. J.; SHI, W.; LUX, R. Effect of titanium and zirconia dental implant abutments on a cultivable polymicrobial saliva community. *J Prosthet Dent*, v. 18, n. 4, p. 481-487, 2017.

DE FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O.; RIBEIRO, R. F.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; PEDRAZZI, V.; DO NASCIMENTO, C. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. *Clin Oral Investig*, v. 22, n. 6, p. 2335-2343, 2018.

DE MIRANDA, R. G.; COLOMBO, A. P. V. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*, v. 22, n. 4, p. 1751-1761, 2017.

DIAZ, P. I.; CHALMERS, N. I.; RICKARD, A. H.; KONG, C.; MILBURN, C. L.; PALMER, R. J., JR.; KOLENBRANDER, P. E. Molecular characterization of subjectspecific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*, v. 72, n. 4, p. 2837-2848, 2006.

DO NASCIMENTO, C.; DA ROCHA AGUIAR, C.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR.; RIBEIRO, R. F. Oral biofilm formation on the titanium and zirconia substrates. *Microsc Res Tech*, v. 76, n. 2, p. 126-132, 2013.

DO NASCIMENTO, C.; DOS SANTOS, J. N.; PEDRAZZI, V.; PITA, M. S.; MONE-SI, N.; RIBEIRO, R. F.; DE ALBUQUERQUE, R. F., JR. Impact of temperature and time storage on the microbial detection of oral samples by Checkerboard DNADNA hybridization method. *Arch Oral Biol*, v. 59, n. 1, p. 12-21, 2014.

DO NASCIMENTO, C.; FERREIRA DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R.; ISSA, J. P.; ITO, I. Y.; LOVATO DA SILVA, C. H.; DE FREITAS OLIVEIRA PARANHOS, H.; DE SOUZA, R. F. Use of the DNA Checkerboard hybridization method for detection and quantitation of *Candida* species in oral microbiota. *Can J Microbiol*, v. 55, n. 5, p. 622-626, 2009.

DO NASCIMENTO, C.; PAULO, D. F.; PITA, M. S.; PEDRAZZI, V.; DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F. Microbial diversity of the supra- and subgingival biofilm of healthy individuals after brushing with chlorhexidine- or silver-coated toothbrush bristles. *Can J Microbiol*, v. 61, n. 2, p. 112-123, 2015.

DO NASCIMENTO, C.; PITA, M. S.; CALEFI, P. L.; DE OLIVEIRA SILVA, T. S.; DOS SANTOS, J. B.; PEDRAZZI, V. Different sealing materials preventing the microbial leakage into the screw-retained implant restorations: an in vitro analysis by DNA checkerboard hybridization. *Clin Oral Implants Res*, v. 28, n. 2, p. 242-250, 2017.

DO, T.; DEVINE, D.; MARSH, P. D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent*, v. 5, p. 11-19, 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.

ENG, A.; BORENSTEIN, E. Taxa-function robustness in microbial communities. *Microbiome*, v. 6, n. 1, p. 45, 2018.

ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; WRIGHTON, K.C.; ZVENIGORODSKY, N.; CHEN, F.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J*, v. 4, n. 5, p. 642647, 2010.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; PATEL, M. R.; SONG, X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, v. 23, n. 3, p. 196-205, 2008.

HAHNEL, S.; WIESER, A.; LANG, R.; ROSENTRITT, M. Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res*, v. 26, n. 11, p. 1297-1301, 2015.

HAHNEL, S.; ROSENTRITT, M.; HANDEL, G.; B€URGERS, R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. *J Mater Sci Mater Med*, v. 20, p. 249–255, 2009.

HOSSEINI, M.; WORSAAE, N.; SCHIODT, M.; GOTFREDSEN, K. A 1-year randomised controlled trial comparing zirconia versus metal-ceramic implant supported single-tooth restorations. *Eur J Oral Implantol*, v. 4, n. 4, p. 347-361, 2011.

JEPSEN, S.; BERGLUNDH, T.; GENCO, R.; AASS, A. M.; DEMIREL, K.; DERKS, J.; FIGUERO, E.; GIOVANNOLI, J. L.; GOLDSTEIN, M.; LAMBERT, F.; ORTIZVIGON, A.; POLYZOIS, I.; SALVI, G. E.; SCHWARZ, F.; SERINO, G.; TOMASI, C.; ZITZMANN, N. U. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*, v. 42 Suppl 16, p. S152-157, 2015.

JERVOE-STORM, P. M.; JEPSEN, S.; JOHREN, P.; MERICSKE-STERN, R.; ENKLING, N. Internal bacterial colonization of implants: association with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res*, v. 26, n. 8, p. 957-963, 2015.

JUNG, R. E.; PJETURSSON, B. E.; GLAUSER, R.; ZEMBIC, A.; ZWAHLEN, M.; LANG, N. P. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res*, v. 19, n. 2, p. 119-130, 2008.

JUNG, R. E.; ZEMBIC, A.; PJETURSSON, B. E.; ZWAHLEN, M.; THOMA, D. S. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res*, v. 23 Suppl 6, p. 2-21, 2012.

KLINGE, B.; MEYLE, J.; WORKING, G. Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clin Oral Implants Res*, v. 23 Suppl 6, p. 108-110, 2012.

LAFURIE, G. I.; SABOGAL, M. A.; CASTILLO, D. M.; RINCON, M. V.; GOMEZ, L. A.; LESMES, Y. A.; CHAMBRONE, L. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol*, v. 88, n. 10, p. 1066-1089, 2017.

LANG, N. P.; WILSON, T. G.; CORBET, E. F. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res*, v. 11 Suppl 1, p. 146-155, 2000.

LARSEN, T.; FIEHN, N. E. Dental biofilm infections - an update. *APMIS*, v. 125, n. 4, p. 376-384, 2017.

LA REAU, A.J.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; SUEN, G. Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microb Genom*, v. 2, n. 12, p. e000099, 2016.

LI, Y.; GUO, Y.; WEN, Z.; JIANG, X.; MA, X.; HAN, X. Weaning stress disturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p. 18068, 2018.

LINDHE, J.; MEYLE, J.; GROUP, D. O. E. W. O. P. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*, v. 35, n. 8 Suppl, p. 282-285, 2008.

LINKEVICIUS, T.; VAITELIS, J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*, v. 26 Suppl 11, p. 139-147, 2015.

LORENZETTI, M.; DOGŠA, I.; STOŠICKI, T.; STOPAR, D.; KALIN, H.; KOBE, S.; NOVAK, S. Influência da modificação superficial na adesão bacteriana a substratos à base de titânio. *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 7, n. 3, p. 1644-1651, 2015.

MANGANO C, MANGANO F, PIATTELLI A, IEZZI G, MANGANO A, LA COLLA L. Prospective clinical evaluation of 307 single-tooth morse taper-connection implants: a multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 25, n. 2, p. 394-400, 2010.

MANGANO, C.; MANGANO, F.; PIATELLI, A.; IEZZI, G.; MANGANO, A.; COLLA, L. Prospective clinical evaluation of 1920 Morse taper connection implants: results after 4 years of functional loading. *Clin. Oral Impl. Res.* v. 20, p. 254-261, 2009.

MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol*, v. 44 Suppl 18, p. S12-S22, 2017.

MAWHINNEY, J.; CONNOLLY, E.; CLAFFEY, N.; MORAN, G.; POLYZOIS, I. An in vivo comparison of internal bacterial colonization in two dental implant systems: identification of a pathogenic reservoir. *Acta Odontol Scand*, v. 73, n. 3, p. 188-194, 2015.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p 386, 2008.

MUDDUGANGADHAR, B. C.; AMARNATH, G. S.; SONIKA, R.; CHHEDA, P. S.; GARG, A. Meta-analysis of Failure and Survival Rate of Implant-supported Single Crowns, Fixed Partial Denture, and Implant Tooth-supported Protheses. *J Int Oral Health*, v. 7, n. 9, p. 11-17, 2015.

NAKAMURA, K.; KANNO, T.; MILLEDING, P.; ORTENGREN, U. Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review. *Int J Prosthodont*, v. 23, n. 4, p. 299-309, 2010.

NOGUCHI, T.; SHIBA, H.; KOMATSUZAWA, H.; MIZUNO, N.; UCHIDA, Y.; OUHARA, K.; ASAKAWA, R.; KUDO, S.; KAWAGUCHI, H.; SUGAI, M.; KURIHARA, H. Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Inflammation*, v. 27, n. 6, p. 341-349, 2003.

NOTHDURFT, F. P.; FONTANA, D.; RUPPENTHAL, S.; MAY, A.; AKTAS, C.; MEHRAEIN, Y.; LIPP, P.; KAESTNER, L. Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. *Clin Implant Dent Relat Res*, v. 17, n. 6, p. 1237-1249, 2015.

OKABE, E.; ISHIHARA, Y.; KIKUCHI, T.; IZAWA, A.; KOBAYASHI, S.; GOTO, H.; KAMIYA, Y.; SASAKI, K.; BAN, S.; NOGUCHI, T.; KAWAI, T.; MITANI, A. Adhesion properties of human oral epithelial-derived cells to zirconia. *Clin Implant Dent Relat Res*, v. 18, n. 5, p. 906-916, 2016.

PADIAL-MOLINA, M.; LOPEZ-MARTINEZ, J.; O'VALLE, F.; GALINDO-MORENO, P. Microbial Profiles and Detection Techniques in Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res*, v. 7, n. 3, p. e10, 2016.

PAPAPANOU, P. N.; MADIANOS, P. N.; DAHLEN, G.; SANDROS, J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci*, v. 105, n. 5 Pt 1, p. 389-396, 1997.

PASSOS, S. P.; GRESSLER MAY, L.; FARIA, R.; OZCAN, M.; BOTTINO, M. A. Implant-abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 101, n. 7, p. 1321-1328, 2013.

PEREZ-CHAPARRO, P. J.; DUARTE, P. M.; SHIBLI, J. A.; MONTENEGRO, S.; LACERDA HELUY, S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; FERES, M. The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J Periodontol*, v. 87, n. 11, p. 1295-1304, 2016.

PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1999.

PITT, T.L.; SAUNDERS, N.A. Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J Clin Pathol*, v. 53, n. 1, p. 71-75, 2000.

PJETURSSON, B. E.; TAN, K.; LANG, N. P.; BRAGGER, U.; EGGER, M.; ZWAHLEN, M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res*, v. 15, n. 6, p. 667-676, 2004.

PJETURSSON, B. E.; THOMA, D.; JUNG, R.; ZWAHLEN, M.; ZEMBIC, A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res*, v. 23, n. 6, p. 22-38, 2012.

PYE, A. D.; LOCKHART, D. E.; DAWSON, M. P.; MURRAY, C. A.; SMITH, A. J. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*, v. 72, n. 2, p. 104-110, 2009.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1995.

RAFFAINI, F. C.; FREITAS, A. R.; SILVA, T. S. O.; CAVAGIONI, T.; OLIVEIRA, J. F.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. F.; PEDRAZZI, V.; RIBEIRO, R. F.; DO NASCIMENTO, C. Genome analysis and clinical implications of the bacterial communities in early biofilm formation on dental implants restored with titanium or zirconia abutments. *Biofouling*, v. 34, n. 2, p. 173-182, 2018.

RAKIC, M.; GRUSOVIN, M. G.; CANULLO, L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 31, n. 2, p. 359-368, 2016.

SALVI, G.E.; LANG, N.P. Diagnostic Parameters for Monitoring Peri-implant Conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 19, p. 116-127, 2004.

RIMONDINI, L.; CERRONI, L.; CARRASSI, A.; TORRICELLI, P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 17, n. 6, p. 793-798, 2002.

ROEHLING, S.; ASTASOV-FRAUENHOFFER, M.; HAUSER-GERSPACH, I.; BRAISSANT, O.; WOELFLER, H.; WALTIMO, T.; KNIHA, H.; GAHLERT, M. In Vitro Biofilm Formation on Titanium and Zirconia Implant Surfaces. *J Periodontol*, v. 88, n. 3, p. 298-307, 2017.

SAILER, I.; ZEMBIC, A.; JUNG, R. E.; SIEGENTHALER, D.; HOLDEREGGER, C.; HAMMERLE, C. H. Randomized controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for canine and posterior single-tooth implant reconstructions: preliminary results at 1 year of function. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, n. 3, p. 219-225, 2009.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res*, v. 40, n. 3, p. 277-285, 2005.

SALVI, G. E.; LANG, N. P. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 19 Suppl, p. 116-127, 2004.

SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; CAPUTI, S.; FAVERO, G. A.; PIATTELLI, A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*, v. 75, n. 2, p. 292-296, 2004.

SCHAUMANN, S.; STAUFENBIEL, I.; SCHERER, R.; SCHILHABEL, M.; WINKEL, A.; STUMPP, S.N.; EBERHARD, S.N.; STIESCH, M. Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites. *BMC Oral Health*. v. 14, p. 157, 2014.

SCHLOSS, P.D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S.L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.

SICILIA, A.; QUIRYNEN, M.; FONTOLLIET, A.; FRANCISCO, H.; FRIEDMAN, A.; LINKEVICIUS, T.; LUTZ, R.; MEIJER, H. J.; ROMPEN, E.; ROTUNDO, R.; SCHWARZ, F.; SIMION, M.; TEUGHEL, W.; WENNERBERG, A.; ZUHR, O. Long-term stability of peri-implant tissues after bone or soft tissue augmentation. Effect of zirconia or titanium abutments on peri-implant soft tissues. Summary and consensus statements. The 4th EAO Consensus Conference 2015. *Clin Oral Implants Res*, v. 26, n. 11, p. 148-152, 2015.

SMALL, P. N.; TARNOW, D. P. Gingival recession around implants: a 1-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 15, n. 4, p. 527-532, 2000.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000, v. 38, p. 135-187, 2005.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, J. A.; UZEL, N. G.; GOODSON, J. M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*, v. 19, n. 6, p. 352-362, 2004.

SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; LEVIN, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, v. 17, n. 4, p. 788-792, 1994.

STOKMAN MA, VAN WINKELHOFF AJ, VISSINK A, SPIJKERVET FK, RAGHOEBAR GM. Bacterial colonization of the peri-implant sulcus in dentate patients: a prospective observational study. *Clin Oral Investig*, v. 21, n. 2, p.717-724, 2017.

SUN, F.; AHMED, A.; WANG, L.; DONG, M.; NIU, W. Comparison of oral microbiota in orthodontic patients and healthy individuals. *Microb Pathog*, v. 123, p. 473-477, 2018.

TELES, R. P.; GURSKY, L. C.; FAVERI, M.; ROSA, E. A.; TELES, F. R.; FERES, M.; SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Relationships between subgingival mi-

crobiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 37, n. 4, p. 313-323, 2010.

TEUGHEL, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*, v. 17 Suppl 2, p. 68-81, 2006.

TRICHES, T. C.; ZIMMERMANN, G. S.; DE FREITAS, S. F. T.; XIMENES, M.; VIEIRA, R. S.; CORDEIRO, M. M. R. Efficacy of a single session protocol for endodontic treatment in primary teeth: in vivo study. *Eur Arch Paediatr Dent*, v. 19, n. 1, p. 47-55, 2018.

VAN BRAKEL, R.; CUNE, M. S.; VAN WINKELHOFF, A. J.; DE PUTTER, C.; VERHOEVEN, J. W.; VAN DER REIJDEN, W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, n. 6, p. 571-577, 2011.

VAN BRAKEL, R.; MEIJER, G. J.; VERHOEVEN, J. W.; JANSEN, J.; DE PUTTER, C.; CUNE, M. S. Soft tissue response to zirconia and titanium implant abutments: an in vivo within-subject comparison. *J Clin Periodontol*, v. 39, n. 10, p. 995-1001, 2012.

VETTORE, M. V.; LEAO, A. T.; LEAL MDO, C.; FERES, M.; DE FIGUEIREDO, L. C.; SHEIHAM, A. Periodontal bacterial load: a proposed new epidemiological method for periodontal disease assessment. *J Contemp Dent Pract*, v. 11, n. 1, p. E049-056, 2010.

WATKIN, A.; KERSTEIN, R.B. Improving darkened anterior peri-implant tissue color with zirconia custom implant abutments. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. v.29, p. 238-40, 2008.

WHELEN, A.C.; PERSING, D.H. The role of nucleic acid amplification and detection in the clinical microbiology laboratory. *Annu Rev Microbiol*, v. 50, p. 349-373, 1996.

YU, P.; WANG, C.; ZHOU, J.; JIANG, L.; XUE, J.; LI, W. Influence of surface properties on adhesion forces and attachment of *Streptococcus mutans* to zirconia in vitro. *Biomed Res Int*, 8901253, 2016.

ZEMBIC, A.; BOSCH, A.; JUNG, R. E.; HAMMERLE, C. H.; SAILER, I. Five-year results of a randomized controlled clinical trial comparing zirconia and titanium abutments supporting single-implant crowns in canine and posterior regions. *Clin Oral Implants Res*, v. 24, n. 4, p. 384-390, 2013.

ZEMBIC, A.; KIM, S.; ZWAHLEN, M.; KELLY, J. R. Systematic review of the survival rate and incidence of biologic, technical, and esthetic complications of single implant abutments supporting fixed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 29 Suppl, p. 99-116, 2014.

ZEMBIC, A.; SAILER, I.; JUNG, R. E.; HAMMERLE, C. H. Randomized-controlled clinical trial of customized zirconia and titanium implant abutments for single-tooth

implants in canine and posterior regions: 3-year results. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, n. 8, p. 802-808, 2009.

ZHENG H, XU L, WANG Z, LI L, ZHANG J, ZHANG Q, CHEN T, LIN J, CHEN F.
Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep*, v. 16, n. 5, p. 10948, 2015.