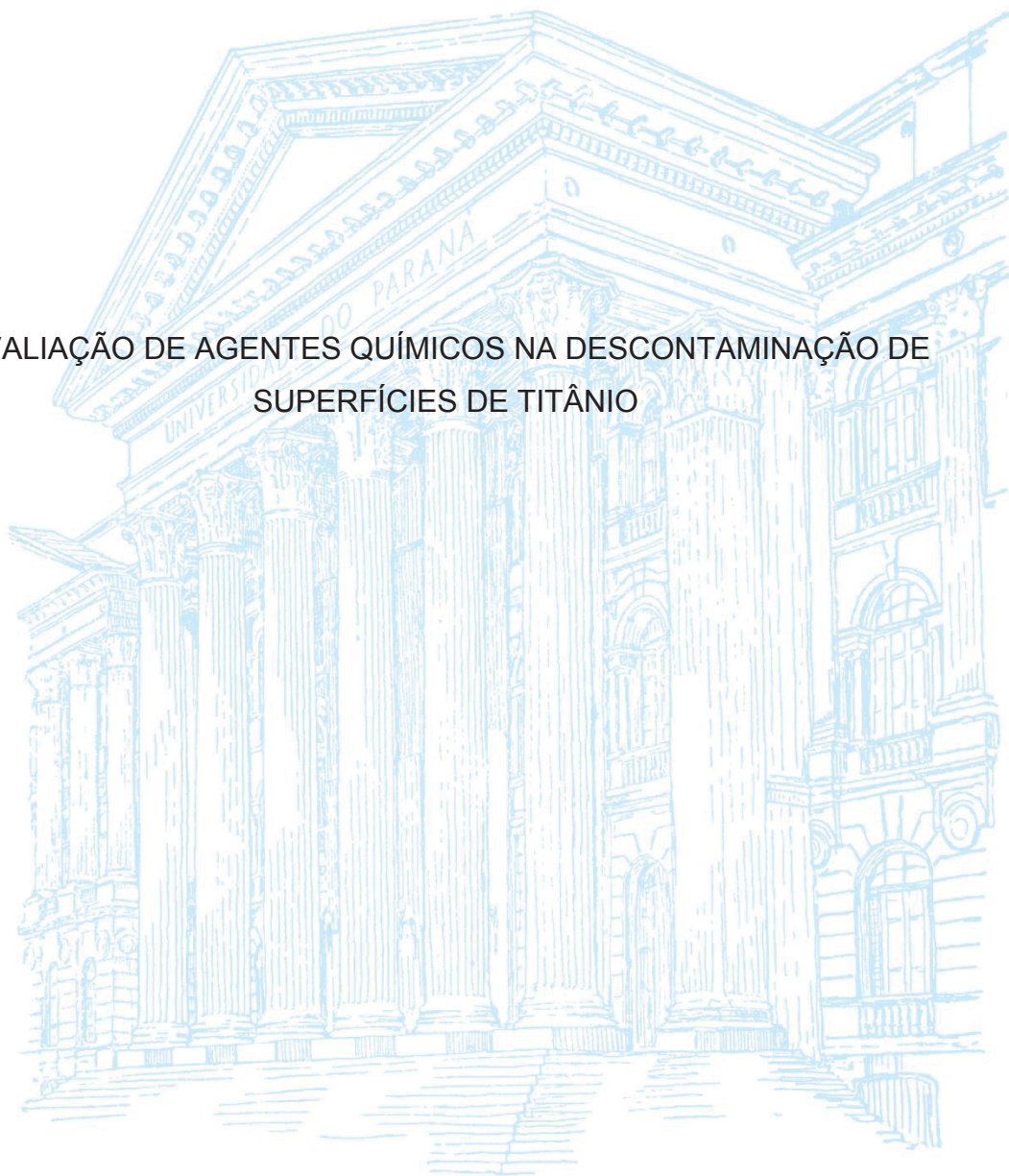


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
EDUARDO HENRIQUE DE SOUZA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO



CURITIBA

2019

EDUARDO HENRIQUE DE SOUZA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE
SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo
Schwartz-Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Geisla Mary Silva
Soares

CURITIBA

2019

Oliveira, Eduardo Henrique de Souza

Avaliação de agentes químicos na descontaminação de superfícies de titânio [recurso eletrônico] / Eduardo Henrique de Souza Oliveira – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho

Coorientadora: Professora Dra. Geisla Mary Silva Soares

1. Peri-implantite. 2. Descontaminação. 3. Implantes dentários. I. Schwartz-Filho, Humberto Osvaldo. II. Soares, Geisla Mary Silva. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.693



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EDUARDO HENRIQUE DE SOUZA OLIVEIRA** intitulada: **AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, que após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Julho de 2019.

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RANDER MOREIRA MACEDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

RUBENS MORENO FREITAS

Avaliador Externo (INSTIT LATINO AMERICANO PESQ E ENS ODONTOLOGICO ILAPEO LTDA)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir exercer minhas atividades de forma justa, com saúde e perseverança ao longo deste caminho, além de dispor pessoas a minha volta que me ajudaram a chegar neste fim.

Ao Prof. Dr. Humberto Schwartz-Filho, por ter me dado a oportunidade e o privilégio de compartilhar essa etapa da minha vida profissional e também pessoal. Obrigado pela amizade e por sempre mostrar o caminho com muito respeito e dedicação.

A Prof^a. Dr^a. Geisla Soares, por ter me dado suporte e transferido um pouco de seu vasto conhecimento. Obrigado pela paciência nos momentos de dificuldade e por sempre mostrar o caminho com solidez e firmeza.

À Coordenadora do Programa e Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná, Prof^a. Dr^a. Juliana Lucena Schussel e demais professores do programa pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos. Um agradecimento especial aos professores da Periodontia Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho, Prof^a. Dr^a. Geisla Soares, Prof. Dr. João Paulo Steffens e Prof^a. Dr^a. Reila Tainá Mendes pelos debates científicos.

Aos colegas do Mestrado pela parceria dentro e fora do programa. Um carinho para os meus companheiros de Periodontia Henrique e Natalie. Ao colega Marcelo Y. Sakamoto pela parceria em todas as etapas do Mestrado. Valeu o apoio!

À técnica do Laboratório de Patologia Bruna Colombo, pela inestimável colaboração no trabalho microbiológico ao ceder estrutura e conhecimento.

Às alunas de Iniciação científica Giovana Carneiro e Viviane Rankel pela ajuda fundamental para o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Ao Prof. Gastão Valle Nicolau e equipe da empresa Systhex[®], por todo apoio técnico-científico disponibilizado para execução deste estudo.

Aos meus colegas de trabalho de consultório e da Instituição Europrótese pelo incondicional apoio durante os períodos em que estive que estar presente nas aulas/pesquisa do Programa de Mestrado.

Ao meu pai, mãe, avó, avô (Jair, Rita, Alaide, Manoel) e familiares por terem me oferecido condições e educação para me tornar o profissional e homem que sou. Hoje finalizo uma fase e em todos os passos pude contar com seu apoio. Amo muito vocês.

À minha namorada, Jordana Senff, por ser tão companheira e atenciosa por todo esse tempo. Obrigado por todos os maravilhosos momentos que estamos vivendo juntos e por toda a ajuda. Te amo!!

À todos que de alguma forma colaboraram ou apoiaram este trabalho.

RESUMO

A peri-implantite é uma condição patológica, associada ao biofilme dental, que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes osseointegráveis e que, se não tratada, acarreta na perda progressiva do osso de suporte. O tratamento desta por meio da limpeza e total descontaminação dos implantes pode ser um desafio, em vista do tipo de topografia da superfície encontrada. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar quatro diferentes agentes químicos de descontaminação em discos de titânio com superfícies usinada, microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia. Foi realizado estudo *in vitro*, no qual 60 discos de titânio foram submetidos à cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e subdivididos conforme padrão de superfície e tratamento de descontaminação por 60 segundos (solução tampão-fosfato 1x, tetraciclina em pasta, digluconato de clorexidina gel 2% e BlueM® gel) (n=5). A análise comparativa dos graus de descontaminação bacteriana foi feita através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em seguida o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. O grupo de discos descontaminados por Clorexidina gel 2% apresentou diferença estatística em relação ao grupo BlueM® gel em todas as superfícies em se tratando de remanescentes bacterianos. Através desta metodologia, este trabalho sugere que o digluconato de clorexidina gel a 2% foi superior aos outros tratamentos avaliados independente da rugosidade das superfícies e que as superfícies não apresentaram influência nos resultados dos métodos de descontaminação avaliados.

Palavras-chave: Peri-implantite. Descontaminação. Implantes Dentários.

ABSTRACT

Peri-implantitis is a pathological condition associated with dental biofilm that occurs in tissues around osseointegrated implants and, if untreated, leads to progressive loss of the supporting bone. Its treatment by cleaning and total decontamination of implants can be a challenge, considering the surface's topography type. Therefore, this study aimed to evaluate four different chemical decontamination agents in titanium discs with machined surfaces, microtopography and microtopography associated with nanotopography. An in vitro study was carried out in which 60 titanium discs were submitted to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* culture and subdivided according to surface standard and decontamination treatment for 60 seconds (1x phosphate buffer solution, tetracycline paste, chlorhexidine digluconate gel 2% and BlueM® gel) (n = 5). The comparative analysis of the degrees of bacterial decontamination was done through the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn multiple-comparison test. The group of discs decontaminated by chlorhexidine gel 2% presented statistical difference in relation to the BlueM® gel group in all surfaces in the case of bacterial remnants. Using this methodology, this work suggests that the chlorhexidine 2% gel digluconate was superior to the other treatments evaluated regardless of surface roughness and that the surfaces had no influence on the results of the decontamination methods evaluated.

Keywords: Peri-implantitis. Decontamination. Dental implants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto macroscópico do disco.....	17
Figura 2 – Fixação dos discos de titânio no anteparo plástico previamente fixado na tampa das placas de 24 poços com adesivo instantâneo (A) e discos fixados nos anteparos plásticos (B).....	19
Figura 3 – Discos de titânio em contato com suspensão bacteriana. Vista Lateral (A) e Superior (B).....	20
Figura 4 – Execução da descontaminação utilizando haste flexível com algodão (A) e Agentes de descontaminação dispensados em potes Dappen esterilizados (B).....	22
Figura 5 – Mergulho único individual em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x.....	22
Figura 6 – Disposição dos discos em meio de cultura caldo BHI Broth + 5% Tween 20 (2 ml/poço).....	23
Figura 7 – Coleta de 200 µl de suspensão e execução de diluições seriadas em placas de 96 poços.....	23
Figura 8 – Semeadura em Placa de Ágar BHI.....	24
Figura 9 – Aspecto macroscópico de placa com Ágar BHI contendo Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (seta).....	25
Figura 10 - Sequencia das etapas da metodologia executada.....	25

Figura 11 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação dos discos com superfícies usinadas, com microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia.....	38
Figura 12 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por PBS 1x.....	39
Figura 13 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por Tetraciclina pasta (50mg/ml).....	41
Figura 14 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por BlueM [®] Gel.....	42
Figura 15 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície usinada.....	45
Figura 16 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície de microtopografia.....	46
Figura 17 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície de microtopografia associada a nanotopografia.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção dos discos de titânio.....	17
3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio.....	18
a) Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	18
b) Inoculação dos Discos de Titânio.....	18
3.3 Descontaminação de Superfície.....	20
3.4 Análise Estatística.....	25
4. ARTIGO.....	27
4.1 USO DE AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO.....	27
4.2 RESUMO.....	28
4.3 INTRODUÇÃO.....	28
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.4.1 Obtenção dos discos de titânio.....	30
4.4.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio	31
a) Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	31
b) Inoculação dos Discos de Titânio	32
4.4.3 Descontaminação de Superfície.....	33
4.4.4 Análise Estatística.....	37
4.5 RESULTADOS.....	37
4.5.1 ANÁLISE POR AGENTE DE DESCONTAMINAÇÃO.....	39
a) Solução tampão fosfato-salino 1x (PBS).....	39
b) Tetraciclina Pasta (50 mg/ml).....	40
c) BlueM® Gel.....	42
d) Digluconato de Clorexidina Gel 2%.....	43
4.5.2 ANÁLISE POR TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE.....	45
a) Usinados.....	45
b) Microtopografia.....	46

c) Microtopografia associada a Nanotopografia.....	47
4.6 DISCUSSÃO.....	48
4.7 CONCLUSÕES.....	55
4.8 REFERÊNCIAS.....	55
5 CONCLUSÕES.....	61
6 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO 1 – AUTHOR`S GUIDELINES.....	70

1. INTRODUÇÃO

Os tratamentos reabilitadores de pacientes parcial ou totalmente desdentados, a fim de devolver sua função mastigatória e estética de forma eficiente, foram aperfeiçoados através do desenvolvimento dos implantes osseointegrados. Desde a sua criação, há mais de 50 anos, os materiais que compõem tais implantes, assim como seu formato e propriedades de superfície vem sofrendo diversas alterações buscando aprimorar a qualidade da osseointegração. (ALBREKTSSON e WENNERBERG, 2005)

As pesquisas científicas objetivando um aumento na integração osso-implante e uma formação óssea mais eficiente tem priorizado a atenção para alterações nas superfícies de titânio dos implantes (SCHWARTZ-FILHO et al. 2012). Diferentes superfícies têm sido testadas em diferentes modelos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo*, de forma que alterações na superfície podem favorecer acelerando a osseointegração (DAVIES, 1998) e aumentando o contato osso-implante (WENNERBERG et al. 1998). Foi demonstrado que a micro e a nanotopografia das estruturas de superfície afetam a adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares, expressão de RNAm, além da síntese e secreção proteica, que podem ter efeitos benéficos sobre a formação da interface osso-implante (JIMBO et al., 2012; de OLIVEIRA e NANJI, 2004; PAPALEXIOU et al., 2004).

Apesar do acelerado e constante avanço tecnológico na área de tratamentos de superfície de titânio dos implantes odontológicos, a contaminação bacteriana, presença de toxina e/ou de produtos inflamatórios reacionais podem impedir a ocorrência da cicatrização biológica dos mesmos (MEFFERT, LANGER e FRITZ, 1992; MOUHYI, DOHAN EHRENFEST e ALBREKTSSON, 2012). A

colonização bacteriana é estruturada na forma de biofilme (LISTGARTEN, 1997; CHARALAMPAKIS e BELIBASAKIS, 2015) com um padrão de colonização que parece ser inicialmente lentificado em comparação com a dentição natural, devido à ausência de microbiota indígena (QUIRYNEN et al., 2005; CHARALAMPAKIS e BELIBASAKIS, 2015). A formação de biofilmes na superfície do implante parece ser influenciada pelas propriedades da superfície do implante, incluindo composição química, rugosidade superficial e energia livre de superfície (HEITZ-MAYFIELD e LANG, 2010; TEUGHELIS et al., 2006; ALMAGUER-FLORES et al. 2012).

A condição patológica associada ao biofilme que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação na mucosa peri-implantar e subsequente reabsorção progressiva do osso de suporte foi definida como Peri-implantite (CATON et al., 2018). De forma similar ao que ocorre com os dentes naturais, os tecidos peri-implantares podem ser atingidos pelos processos inflamatórios e infecciosos resultando clinicamente no aumento da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, supuração, perda óssea, mobilidade clínica e, por fim, perda do implante (MOMBELLI et al., 1987; ALBREKTSSON, JOHANSSON e SENNERBY, 1994; TONETTI, PRATO e CORTELLINI, 1996; CATON et al., 2018).

A prevalência da peri-implantite parece ter aumentado nos últimos anos. Em uma revisão sistemática e metanálise publicada por DERKS et al. (DERKS et al., 2015), foi demonstrada a presença de 1- 47% de peri-implantite nos casos analisados, com média de 22%. ROSS-JANSACKER et al. (ROSS-JANSACKER, RENVERT e EGELBERG, 2003), em outra revisão sistemática, apontaram algumas incertezas sobre o tratamento da peri-implantite, como quais métodos

de descontaminação são mais adequados para os vários tipos de superfícies de implantes e a questão do potencial de reosseointegração de uma superfície de implante previamente contaminada.

Com relação a microbiota peri-implantar, em condições saudáveis, a composição é estruturada principalmente por Cocos Gram-positivos e bacilos não-móveis, além de algumas espécies anaeróbias Gram-negativas (MOMBELLI et al., 1987), semelhante a microbiota encontrada no sulco gengival em condições de saúde. (MOMBELLI et al., 1987; QUIRYNEN e LISTGARTEN, 1990) Foram encontradas evidências de espiroquetas, bacilos móveis, espécies pigmentadas de negro e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.) (MOMBELLI et al., 1987; MOMBELLI e DECAILLET, 2011; ROSENBERG, TOROSIAN e SLOTS, 1991). Através de análise por PCR foi possível a detecção de patógenos frequentemente associados a lesões periodontais, como *P. gingivalis* (GALASSI et al., 2012; DEVIDES e FRANCO, 2006), *P. intermedia* (DEVIDES e FRANCO, 2006; AL-RADHA et al., 2012), *Fusobacterium spp.* (AL-RADHA et al., 2012), além do *A. actinomycetemcomitans*. (DEVIDES e FRANCO, 2006; PEREZ-CHAPARRO et al., 2016).

Organizados em biofilme, os micro-organismos podem apresentar fenótipo relativamente alterado em relação a taxa de crescimento, transcrição gênica e resistência bacteriana. (PATEL, 2005; AMARASINGHE, SCANNAPIECO e HAASE, 2009; FREIRE et al., 2011) Foi demonstrado por FREIRE et al. (FREIRE et al. 2011) que o *A. actinomycetemcomitans* (A. a.) tem capacidade de formação de biofilme em implantes dentários, resultando em resposta inflamatória, osteólise e destruição tecidual quando implantados em modelos animais. Este micro-organismo é um patógeno periodontal, observado

principalmente no início da doença periodontal, em peri-implantite e já foi observada a sua capacidade de formação de biofilme em modelos *in vitro* em implantes (ZHUANG et al., 2016).

Baseado na semelhança entre a doença periodontal e a doença peri-implantar, as terapias propostas a esta se baseiam nos relatos científicos encontrados nos tratamentos para aquela, consistindo prioritariamente na redução da carga bacteriana patogênica das bolsas peri-implantares e da superfície dos implantes, utilizando, ou não, em conjunto técnicas de regeneração óssea e a reosseointegração (HEITZ-MAYFIELD E LANG, 2004). Os principais tratamentos propostos envolvem: a remoção mecânica do biofilme (raspagem manual com curetas de aço ou teflon; uso de brocas ou escovas; jatos abrasivos; laserterapia)(SPEELMAN, COLLAERT e KLINGE, 1992; BROOKSHIRE et al., 1997; MOMBELLI e LANG, 1998; LANG, WILSON e CORBET, 2000; SUH et al., 2003; HEITZ-MAYFIELD e LANG, 2004; SCHOU, BERGLUNDH e LANG, 2004; SCHWARZ et al., 2017), uso de antimicrobianos sistêmicos, descontaminação química da superfície dos implantes (tetraciclina; digluconato de clorexidina; ácido cítrico; peróxido de hidrogênio; ácido fosfórico 35%)(MELLADO-VALERO et al., 2013; MEFFERT, LANGER e FRITZ, 1992; SCHENK et al., 1997; PARMA-BENFENATI et al., 2015; LANG, WILSON e CORBET, 2000; ZABLOTSKY et al., 1992; ZABLOTSKY, 1993; ROOS-JANSAKER et al., 2011; SUBRAMANI e WISMEIJER, 2012; AL-HASHEDI et al., 2017), além de técnicas cirúrgicas a retalho e regeneração óssea. (SCHWARZ et al., 2005; SCHWARZ et al., 2006; ROOS-JANSAKER, LINDAHL, et al., 2006A, 2006B; ROOS-JANSAKER, RENVERT, et al. 2006; LINDHE, MEYLE e GROUP 2008; ROCCUZZO et al., 2011).

Apesar de diversos estudos sugerirem técnicas e opções de tratamentos para a peri-implantite, ainda existe muita divergência sobre qual o melhor método ou protocolo de descontaminação bacteriana de superfícies de implantes na presença de peri-implantite (CLAFFEY et al., 2008; SCHWARZ et al., 2011). Sendo assim, considerando a grande diversidade de superfícies e terapias propostas, torna-se importante a padronização dos tratamentos das superfícies dos implantes e das metodologias de descontaminação, tendo em vista o impacto nos resultados que podem ser alcançados.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in vitro* quatro diferentes agentes químicos de descontaminação (Solução Tampão-Fostato 1x, Tetraciclina em pasta, Digluconato de Clorexidina Gel 2% e BlueM® Gel) em discos de titânio com três diferentes superfícies (usinada, microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia) contaminados por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.).

Como objetivos específicos:

1. Descontaminar as superfícies contendo biofilme de A.a por meio do uso de Solução Tampão-Fostato 1x Tetraciclina em pasta, Digluconato de Clorexidina Gel 2% e BlueM® Gel;
2. Comparar a descontaminação em diferentes superfícies de titânio usinadas, com microtopografia e com microtopografia associada a nanotopografia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos discos de titânio

As 60 amostras de titânio utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas e cedidas pela empresa NEODENT[®] (Curitiba, Paraná, Brasil). O tamanho (10 mm x 2 mm) e o formato dos discos utilizados estão representados na Figura 1. Estas amostras, compostas por titânio comercialmente puro (grau 4), foram usinadas no formato de discos e submetidas a um processo de modificação de superfície. A microtopografia foi obtida por um processo de jateamento com partículas de óxido de Alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido (propriedade comercial). A nanotopografia foi obtida pelo tratamento com volumes iguais de uma solução de H₂SO₄ e de H₂O₂ 30% (NANCI et al., 1998).



Figura 1 - Aspecto macroscópico do disco.

3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio

a) Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A cepa de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 29523 (A.a) utilizada é parte do acervo sob responsabilidade da Prof^a. Dra. Geisla M. S. Soares, presente no Laboratório de Estudos Básicos em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

O A.a foi cultivado durante três dias em placa de Agar BHI (Brain Heart Infusion Agar, BD BBL, Texas, USA) + 5% sangue de ovelha (Laborclin, Paraná, Brasil) + 1% hemina (H9039, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Em seguida foi transferido para 10 ml de meio de cultura líquido BHI Broth (Brain Heart Infusion Agar, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA) + Hemina 1% pré-reduzido em anaerobiose. O tubo foi incubado em ambiente de anaerobiose [Sistema BD GasPak EZ (Becto Dickinson, Sparks, MD)], a 37°C. Após 24 horas, a densidade óptica da suspensão foi medida através de um espectrofotômetro (V5100, Metash, Shanghai Instruments) a 600 nm e a concentração ajustada para 10^8 (0,09 e 0,11) células por ml e $1,5 \times 10^6$ células foram adicionadas ao inóculo que foi utilizado para a formação dos biofilmes. Uma vez preparado, ao inóculo foi adicionado 5% de sangue de carneiro e depositado em placas de poliestireno de 24 poços (NUNC-TM) (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark). Em cada poço foram adicionados 1,9 ml do inóculo.

b) Inoculação dos Discos de Titânio

Os discos de titânio foram fixados em anteparos plásticos previamente esterilizados e fixados na tampa de placas de 24 poços com auxílio de pinça anatômica e de adesivo instantâneo (Super Bonder[®], Loctite, São Paulo, Brasil)

agrupados de acordo com seu tratamento de superfície (Figura 2). As placas de 24 poços contendo a suspensão bacteriana e os discos fixados permaneceram incubadas nas mesmas condições de anaerobiose explicada anteriormente, por 48 horas (Figura 3). Então os discos foram encaminhados para os testes de descontaminação e 20 μ l do sobrenadante dos poços em que se encontravam os discos foram semeadas em placas com Agar BHI + 5% sangue + 1% hemina, com a finalidade de se comprovar presença de bactérias viáveis no momento da descontaminação.

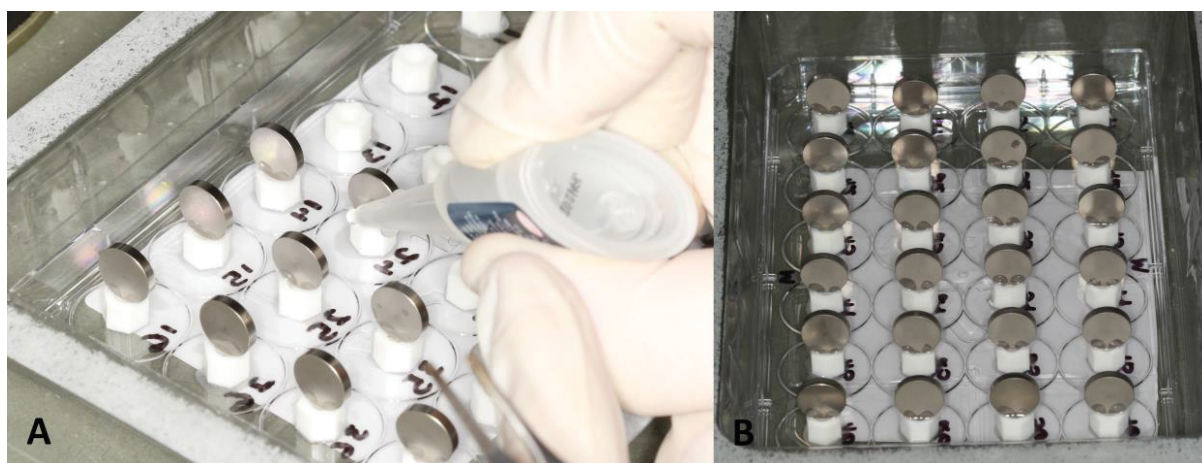


Figura 2 – Fixação dos discos de titânio no anteparo plástico previamente fixado na tampa das placas de 24 poços com adesivo instantâneo (A) e discos fixados nos anteparos plásticos (B).

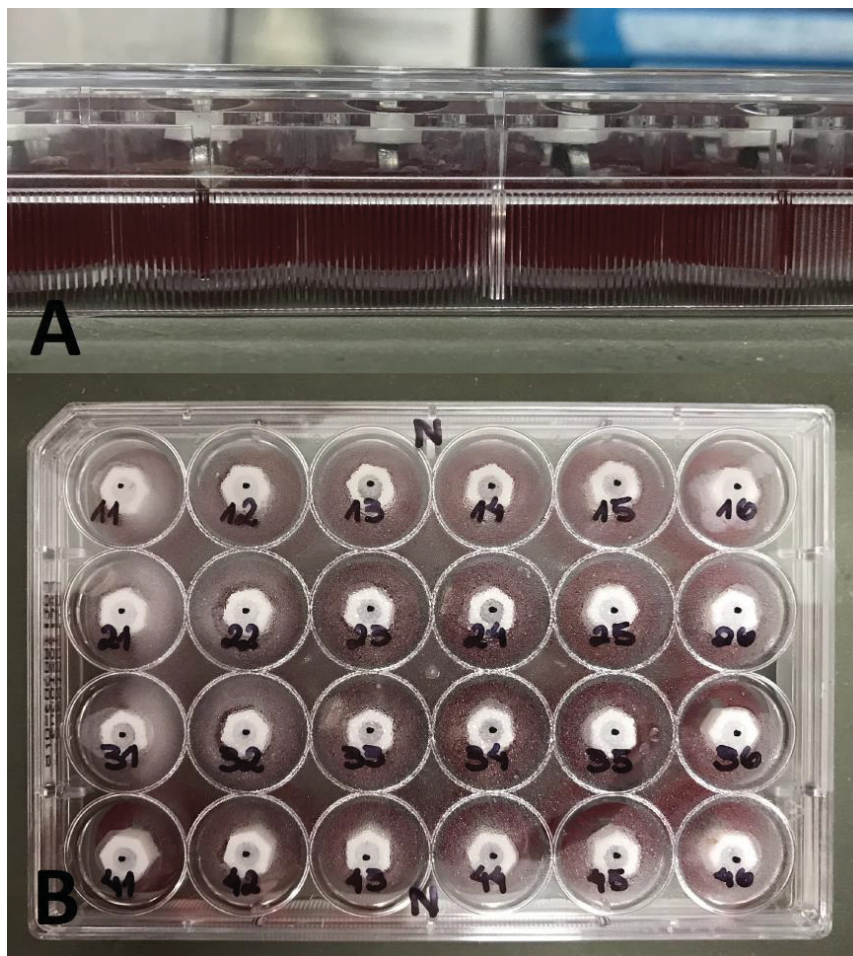


Figura 3 –Discos de titânio em contato com suspensão bacteriana. Vista Lateral (A) e Superior (B).

3.3 Descontaminação de Superfície

Os discos de titânio expostos às colônias (n=60) foram divididos de acordo com seu tratamento de superfície e seu agente de descontaminação, conforme ilustrado no quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos discos de titânio de acordo com superfícies de tratamento e agentes de descontaminação.

Discos Usinados	<ul style="list-style-type: none"> • Solução tampão fosfato-salino 1x (PBS) (n=5); • Tetraciclina Pasta (50mg/ml) (n=5); • BlueM[®] Gel (Peróxido de Hidrogênio) (n=5); • Digluconato de Clorexidina Gel a 2% (n=5).
Discos Microtopografia	
Discos Micro + Nanotopografia	

O mesmo operador, cego quanto ao tipo superfície de cada disco, realizou todos os procedimentos de descontaminação com os diferentes agentes químicos. Anterior e posteriormente a etapa de aplicação dos agentes químicos, cada disco foi mergulhado com auxílio de pinça clínica em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x, 2 ml/poço.

A execução da descontaminação foi padronizada para todos os agentes, sendo composta por movimentos ativos durante 60 segundos (30 segundos em cada face do disco) e utilizando hastes flexíveis com algodão estéril (Figura 4A).

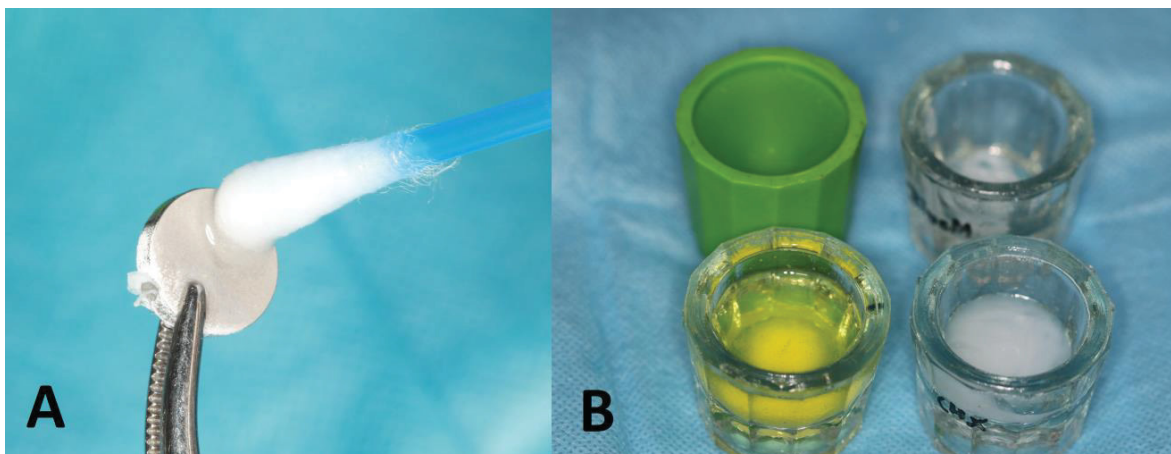


Figura 4 – Execução da descontaminação utilizando haste flexível com algodão (A) e Agentes de descontaminação dispensados em potes Dappen esterilizados (B).

Em seguida, os discos foram dispensados individualmente em poços de novas placas contendo 2 ml/poço de meio de cultura caldo BHI Broth + 5% Tween 20 [ALPHA713 (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil)]. Estas placas de 24 poços contendo os discos passaram por um processo de sonicagem durante 20 segundos para remoção as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) resistentes a descontaminação da superfície dos discos de titânio.

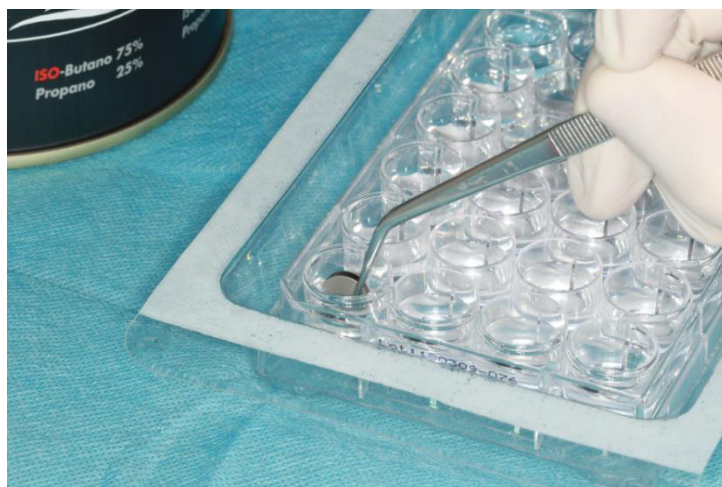


Figura 5 – Mergulho único individual em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x



Figura 6 – Disposição dos discos em meio de cultura caldo BHI Broth + 5% Tween 20 (2ml/poço).

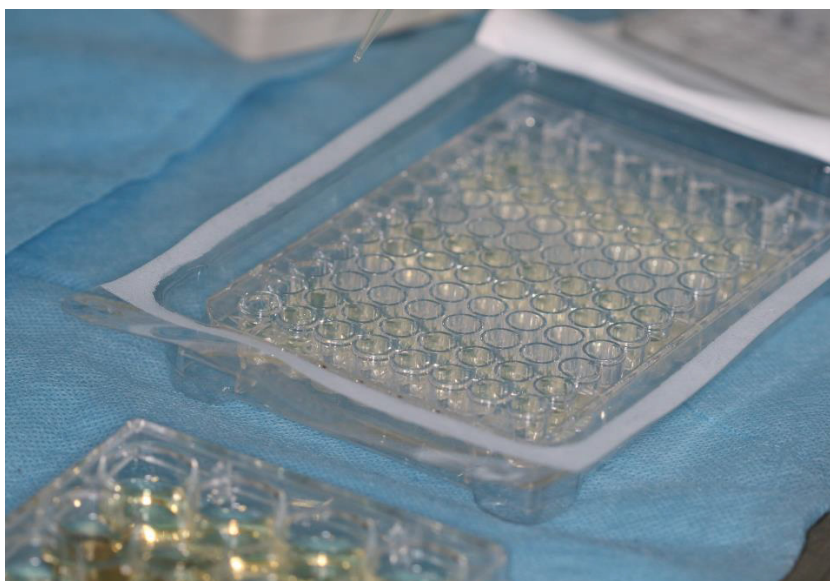


Figura 7 – Coleta de 200 μ l de suspensão e execução de diluições seriadas em placas de 96 poços

De cada poço contendo meio de cultura caldo BHI Broth + 5% de Tween 20 foram coletados 200 μ l de suspensão e feitas duas diluições seriadas em placas de 96 poços, na concentração de 10^{-1} e 10^{-2} . A partir das diluições, foram

coletados 20 µl de cada diluição e, então, semeado o conteúdo em placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% previamente identificadas.

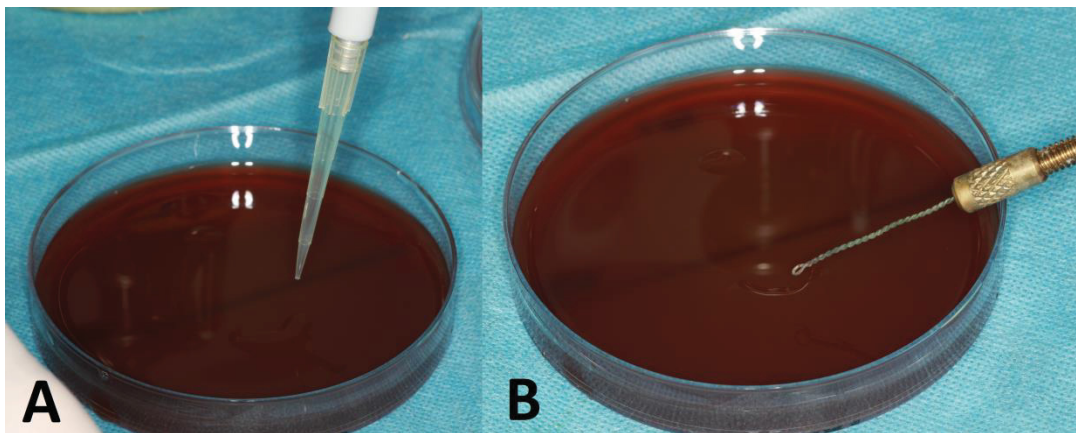


Figura 8 – Semeadura em Placa de Ágar BHI.

As placas de ágar foram mantidas em anaerobiose a 37°C por 5 dias, antes da contagem de UFC.

Através de análise visual das placas de ágar após o período de incubação, foi realizada uma contagem das UFC. Todas as contagens foram realizadas por um mesmo examinador treinado e de forma triplicada, obtendo assim médias das unidades encontradas em cada diluição.

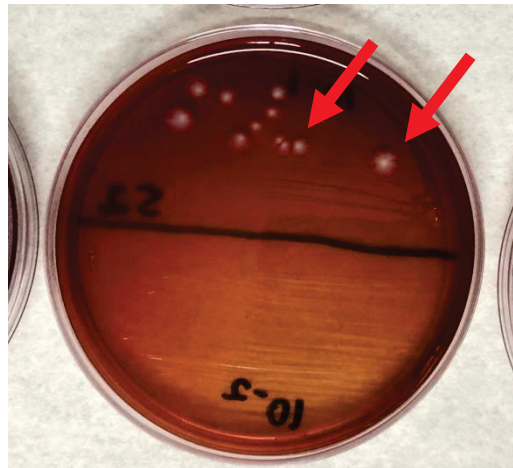


Figura 9– Aspecto macroscópico de placa com Ágar BHI contendo Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (seta)

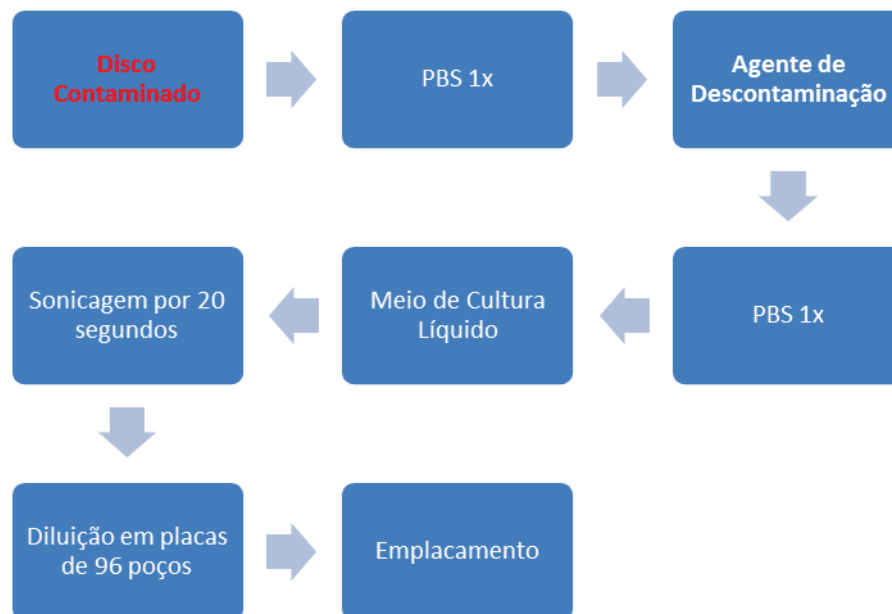


Figura 10 - Sequência das etapas da metodologia executada

3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi aplicada aos dados numéricos obtidos através da análise visual com auxílio do Programa GraphPad Prism (versão Prism 5 for Mac OS X, San Diego), adotando-se em todos os testes o nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Em primeiro momento foi aplicado teste para observar normalidade

dos dados. Na sequência, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

4. ARTIGO

4.1 AVALIAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

Eduardo Henrique de Souza Oliveira, DDS¹

Marcelo Yudi Sakamoto, DDS¹

Geisla Mary Silva Soares, DDS, MSC, PhD¹

Humberto Osvaldo Schwartz-Filho, DDS, MSC, PhD¹

1 Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Correspondência: Humberto Osvaldo Schwartz Filho,

Departamento de Estomatologia

Universidade Federal do Paraná

Rua Prefeito Lothário Meissner 632

80210-170 Jardim Botânico

Curitiba - PR

Fax: 41 3360-4050

Phone: 41 3360-4032

E-mail: betoschwartz@ufpr.br

*Revista Journal of Biomedical Materials Research – Part B – artigo redigido em português no formato orientado pela revista.

4.2 RESUMO

A peri-implantite é uma condição patológica, associada ao biofilme dental, que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes osseointegráveis e que, se não tratada, acarreta na perda progressiva do osso de suporte. O tratamento desta por meio da limpeza e total descontaminação dos implantes pode ser um desafio, em vista do tipo de topografia da superfície encontrada. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar quatro diferentes agentes químicos de descontaminação em discos de titânio com superfícies usinada, microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia. Foi realizado estudo *in vitro*, no qual 60 discos de titânio foram submetidos à cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e subdivididos conforme padrão de superfície e tratamento de descontaminação por 60 segundos (solução tampão-fosfato 1x, tetraciclina em pasta, digluconato de clorexidina gel 2% e BlueM® gel) (n=5). A análise comparativa dos graus de descontaminação bacteriana foi feita através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em seguida o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. O grupo de discos descontaminados por Clorexidina gel 2% apresentou diferença estatística em relação ao grupo BlueM® gel em todas as superfícies em se tratando de remanescentes bacterianos. Através desta metodologia, este trabalho sugere que o digluconato de clorexidina gel a 2% foi superior aos outros tratamentos avaliados independente da rugosidade das superfícies e que as superfícies não apresentaram influência nos resultados dos métodos de descontaminação avaliados.

Palavras-chave: Peri-implantite. Descontaminação. Implantes Dentários.

4.3 INTRODUÇÃO

Apesar do acelerado e constante avanço tecnológico na área de tratamentos de superfície de titânio dos implantes odontológicos, a contaminação bacteriana, presença de toxina e/ou de produtos inflamatórios reacionais podem impedir a

ocorrência da cicatrização biológica dos mesmos. (1, 2) A formação de biofilmes parece ser influenciada por propriedades inerentes à superfície do implante, tais como a composição química, a rugosidade superficial e energia livre superficial (3-5).

A condição patológica associada ao biofilme que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação na mucosa peri-implantar e subsequente perda progressiva do osso de suporte foi definida como peri-implantite (6). Foi demonstrado por Freire et al. (2011) (7) que o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.) tem capacidade de formação de biofilme em implantes dentários, resultando em resposta inflamatória, osteólise e destruição tecidual quando implantados em modelos animais. Este micro-organismo é um patógeno periodontal encontrado principalmente no início da doença periodontal, bem como na peri-implantite, e sua capacidade de formação de biofilme na superfície de implantes já foi demonstrada em modelos *in vitro* (8).

Os principais tratamentos propostos para peri-implantite hoje envolvem: a remoção mecânica do biofilme (raspagem manual com curetas de aço ou teflon; uso de brocas ou escovas; jatos abrasivos; laserterapia)(9-16), uso de antimicrobianos sistêmicos, descontaminação química da superfície dos implantes (tetraciclina; digluconato de clorexidina; ácido cítrico; peróxido de hidrogênio; ácido fosfórico 35%)(1, 12, 17-24), além de técnicas cirúrgicas a retalho e regeneração óssea.(25-31). Todavia, apesar de diversos estudos sugerirem técnicas e opções de tratamentos para a peri-implantite, ainda existe muita divergência sobre qual o melhor método ou protocolo de descontaminação bacteriana de superfícies de implantes na presença de peri-implantite (32, 33). Ross-Jansaker et al.(34), apontou algumas incertezas sobre o tratamento da

peri-implantite, como quais métodos de descontaminação são mais adequados para os vários tipos de superfícies de implantes e a questão do potencial de reosseointegração de uma superfície de implante previamente contaminada. Sendo assim, este estudo teve por objetivo geral avaliar *in vitro* quatro diferentes agentes químicos de descontaminação (Solução tampão-fosfato 1x, Tetraciclina em pasta, Digluconato de Clorexidina Gel 2% e BlueM® Gel) em discos de titânio com três diferentes superfícies (usinada, microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia) contaminados por A. a.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção dos discos de titânio

As 60 amostras de titânio utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas e cedidas pela empresa NEODENT® (Curitiba, Paraná, Brasil). O tamanho (10 mm x 2 mm) e o formato dos discos utilizados estão representados na Figura 1. Estas amostras, compostas por titânio comercialmente puro (grau 4), foram usinadas no formato de discos e submetidas a um processo de modificação de superfície. A microtopografia foi obtida por um processo de jateamento com partículas de óxido de Alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido (propriedade comercial). A nanotopografia foi obtida pelo tratamento com volumes iguais de uma solução de H₂SO₄ e de H₂O₂ 30% (35).



Figura 1 - Aspecto macroscópico do disco.

4.4.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio

a) Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

O A.a foi cultivado durante três dias em placa de Agar BHI (Brain Heart Infusion Agar, BD BBL, Texas, USA) + 5% sangue de ovelha (Laborclin, Paraná, Brasil) + 1% hemina (H9039, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Em seguida foi transferido para 10 ml de meio de cultura líquido BHI Broth (Brain Heart Infusion Agar, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA) + Hemina 1% pré-reduzido em anaerobiose. O tubo foi incubado em ambiente de anaerobiose [Sistema BD GasPak EZ (Becto Dickinson, Sparks, MD)], a 37° C. Após 24 horas, a densidade óptica da suspensão foi medida através de um espectrofotômetro (V5100, Metash, Shanghai Instruments) a 600 nm e a concentração ajustada para 10⁸ (0,09 e 0,11) células por ml e 1,5 x 10⁶ células

foram adicionadas ao inóculo que foi utilizado para a formação dos biofilmes. Uma vez preparado, o inóculo foi adicionado 5% de sangue de carneiro e depositado em placas de poliestireno de 24 poços (NUNC-TM) (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark). Em cada poço foram adicionados 1,9 ml do inóculo.

b) Inoculação dos Discos de Titânio

Os discos de titânio foram fixados em anteparos plásticos previamente esterilizados e fixados na tampa de placas de 24 poços com auxílio de pinça anatômica e de adesivo instantâneo, agrupados de acordo com seu tratamento de superfície (Figura 2). As placas de 24 poços contendo a suspensão bacteriana e os discos fixados permaneceram incubadas nas mesmas condições de anaerobiose explicada anteriormente, por 48 horas (Figura 3). Então os discos foram encaminhados para os testes de descontaminação e 20 µl do sobrenadante dos poços em que se encontravam os discos foram semeadas em placas com Agar BHI + 5% sangue + 1% hemina, com a finalidade de se comprovar presença de bactérias viáveis no momento da descontaminação.

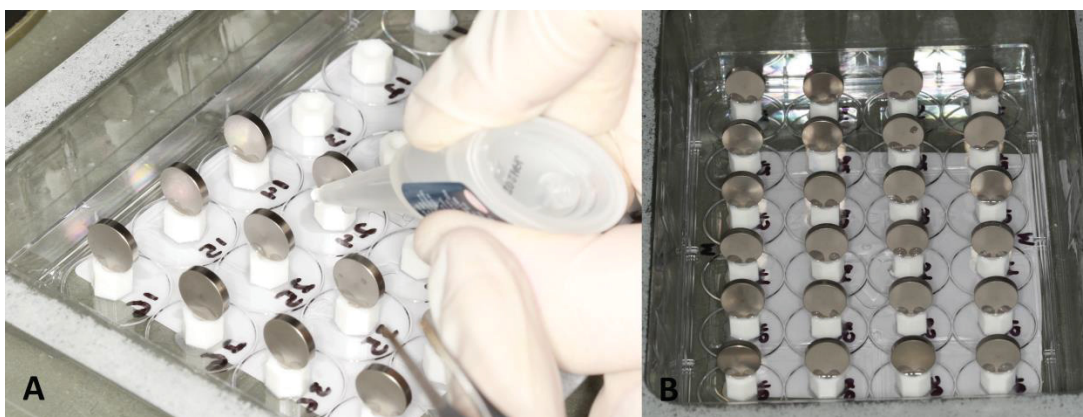


Figura 2 – Fixação dos discos de titânio no anteparo plástico previamente fixado na tampa das placas de 24 poços com adesivo instantâneo (A) e discos fixados nos anteparos plásticos (B).

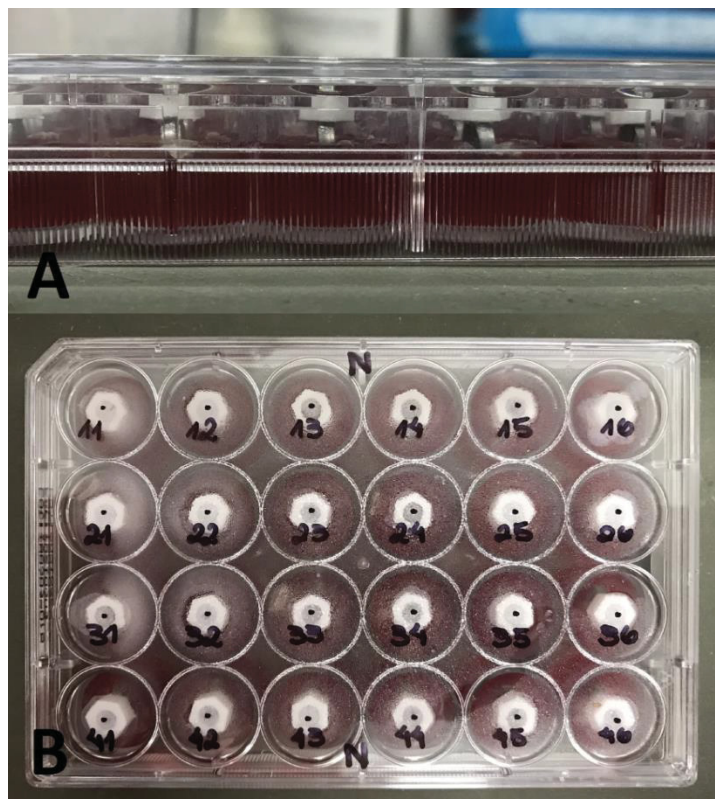


Figura 3 – Discos de titânio em contato com suspensão bacteriana. Vista Lateral (A) e Superior (B).

4.4.3 Descontaminação de Superfície

Os discos de titânio expostos às colônias (n=60) foram divididos de acordo com seu tratamento de superfície e seu agente de descontaminação:

Quadro 1 - Distribuição dos discos de titânio de acordo com superfícies de tratamento e agentes de descontaminação.

Discos Usinados	<ul style="list-style-type: none"> • Solução tampão fosfato-salino 1x (PBS) (n=5); • Tetraciclina Pasta (50mg/ml) (n=5); • BlueM[®] Gel (Peróxido de Hidrogênio) (n=5); • Digluconato de Clorexidina Gel a 2% (n=5).
Discos Microtopografia	
Discos Micro + Nanotopografia	

O mesmo operador, cego quanto ao tipo superfície de cada disco, realizou todos os procedimentos de descontaminação com os diferentes agentes químicos. Anterior e posteriormente à etapa de aplicação dos agentes químicos, cada disco foi mergulhado com auxílio de pinça clínica em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x, 2 ml/poço.

A execução da descontaminação foi padronizada para todos os agentes, sendo composta por movimentos ativos durante 60 segundos (30 segundos em cada face do disco) e utilizando hastes flexíveis com algodão estéril (Figura 4A).

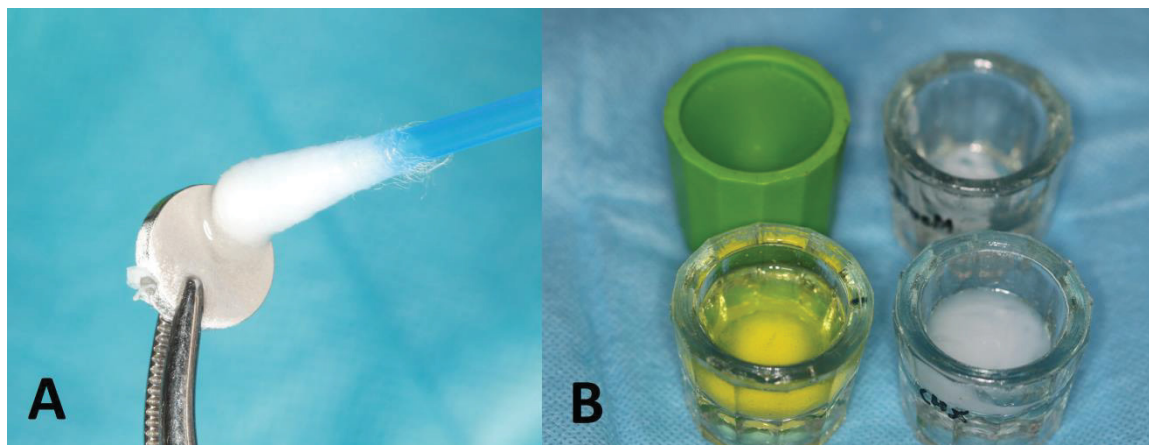


Figura 4 – Execução da descontaminação utilizando haste flexível com algodão (A) e Agentes de descontaminação dispensados em potes Dappen esterilizados (B).

Os discos foram então dispensados individualmente em poços de novas placas contendo 2 ml/poço de meio de cultura caldo BHI Broth + 5% Tween 20 [ALPHA713 (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil)]. Estas placas de 24 poços contendo os discos passaram por um processo de sonicagem durante 20 segundos para remoção as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) resistentes a descontaminação da superfície dos discos de titânio.

De cada poço contendo meio de cultura caldo BHI Broth + 5% de Tween 20 foram coletados 200 μ l de suspensão e feitas duas diluições seriadas em placas de 96 poços, na concentração de 10^{-1} e 10^{-2} . A partir das diluições, foram coletados 20 μ l de cada diluição e, então, semeado o conteúdo em placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% previamente identificadas.

As placas de ágar foram mantidas em anaerobiose a 37°C por 5 dias, antes da contagem de UFC.

4.4.4 Análise Estatística

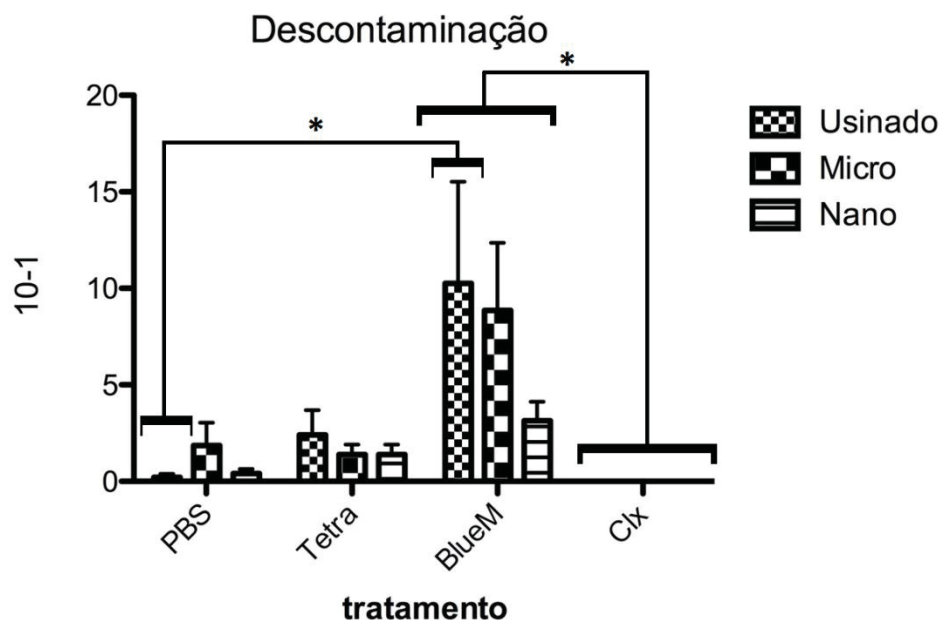
A análise estatística foi aplicada aos dados numéricos obtidos através da análise visual com auxílio do Programa GraphPad Prism (versão Prism 5 for Mac OS X, San Diego), adotando-se em todos os testes o nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$). Em primeiro momento foi aplicado teste para observar normalidade dos dados. Na sequência foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

4.5 RESULTADOS

Os resultados obtidos dos parâmetros de interesse (unidades formadoras de colônias resistentes de acordo com cada superfície e com a metodologia de descontaminação) foram expressos em gráficos nos quais as diferenças estatisticamente significantes foram assinaladas.

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs estão demonstrados no gráfico (Figura 11) e descritos (Tabela 1) através dos valores de média \pm desvio-padrão. A avaliação intergrupos demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo BlueM[®] e o grupo Clorexidina, em todas as superfícies, e entre o grupo BlueM[®] e o grupo PBS 1x, na superfície usinada. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Figura 11 – Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) observada após descontaminação dos discos dos três grupos de superfícies e com os quatro métodos de descontaminação.



As barras representam as médias \pm desvio-padrão. Superfícies tratadas: Usinado; Micro: Microtopografia; Nano: Microtopografia associada a nanotopografia. PBS: PBS 1x, Tetra: Tetraciclina Pasta, BlueM: BlueM Gel e Clx: Clorexidina Gel 2%. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). Os asteriscos (*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 1 - Média e Desvio-padrão do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [$\times 10^{-1}$] encontradas em cada superfície após descontaminação.

DISCOS	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
AGENTE DE DESCONTAMINAÇÃO			
PBS 1x	0,2 \pm 0,45 ^B	1,87 \pm 2,63	0,40 \pm 0,55
Tetraciclina Pasta (50 mg/ml)	2,4 \pm 2,88	1,40 \pm 1,14	1,40 \pm 1,14
BlueM [®] Gel	10,27 \pm 11,76 ^{AB}	8,73 \pm 7,88 ^A	3,13 \pm 2,22 ^A
Digluconato de Clorexidina Gel 2%	0 \pm 0 ^A	0 \pm 0 ^A	0 \pm 0 ^A

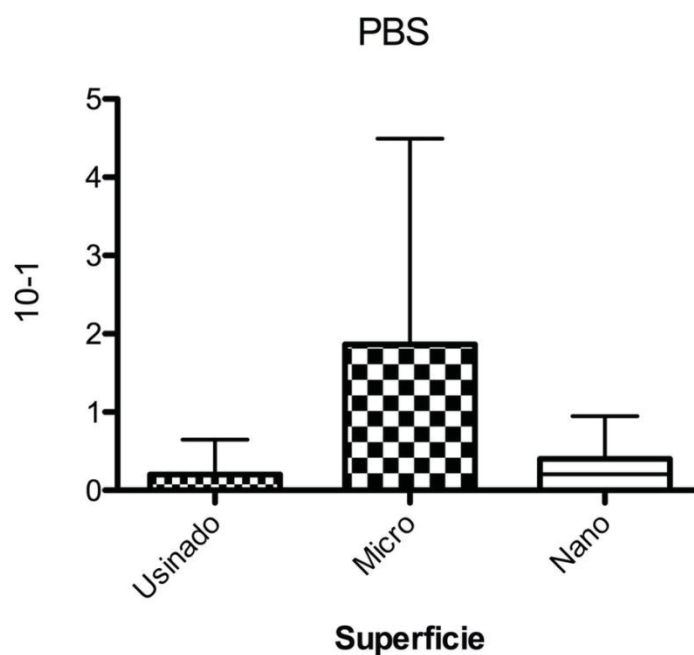
Significante se $p < 0.05$. Letras diferentes nas colunas representam diferenças significantes entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis, Dunn ($P < 0,05$)).

4.5.1 ANÁLISE POR AGENTE DE DESCONTAMINAÇÃO

a) Solução tampão fosfato-salino 1x (PBS)

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação por solução tampão fosfato-salino 1x (PBS) estão demonstrados no gráfico (Figura 12) e descritos (Tabela 2) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os tratamentos de superfície. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 12 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por PBS 1x.



As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com as superfícies usinadas, com microtopografia e com microtopografia associada a nanotopografia. PBS: PBS 1x. Superfícies tratadas: Usinado; Micro: Microtopografia; Nano: Microtopografia associada a nanotopografia. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos das superfícies avaliadas.

Tabela 2 – Média do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [$\times 10^{-1}$] encontradas em cada superfície após descontaminação por PBS 1x.

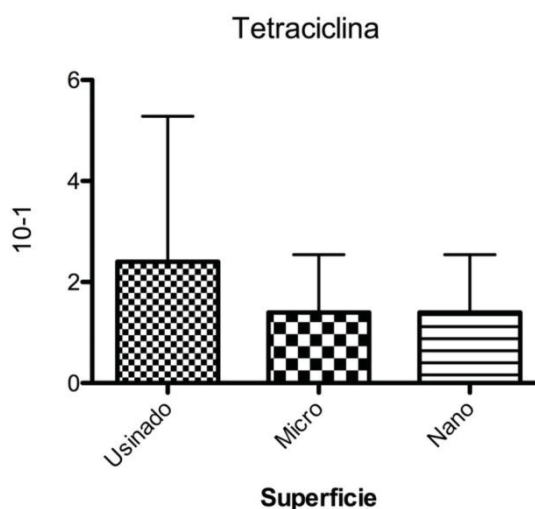
Tratamento de Superfície	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
Agente de Descontaminação			
PBS 1x	1	0	1
	0	1	0
	0	6,33	0
	0	2	1
	0	0	0
Média±Desvio-padrão	0,2 ± 0,45	1,87±2,63	0,40±0,55

Teste de Kruskal-Wallis, Dunn (P<0,05)

b) Tetraciclina Pasta (50mg/ml)

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação por tetraciclina pasta (50mg/ml) estão demonstrados no gráfico (Figura 13) e descritos (Tabela 3) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os tratamentos de superfície. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 13 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por Tetraciclina pasta (50mg/ml).



As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com as superfícies usinadas, com microtopografia e com microtopografia associada a nanotopografia. Superfícies tratadas: Usinado; Micro: Microtopografia; Nano: Microtopografia associada a nanotopografia. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos das superfícies avaliadas.

Tabela 3 - Média do Número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [$\times 10^{-1}$] encontradas em cada superfície após descontaminação por Tetraciclina Pasta (50mg/ml).

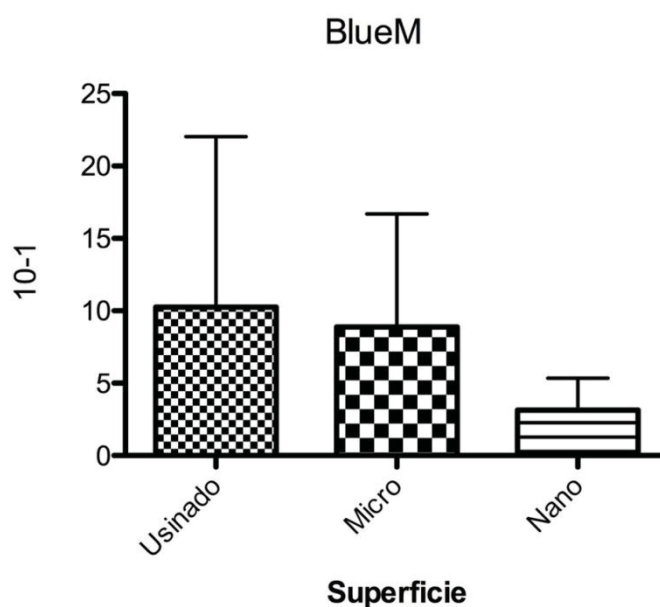
Tratamento de Superfície	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
Agente de Descontaminação			
Tetraciclina Pasta (50 ml/ml)	5	3	1
	0	2	0
	6	1	2
	1	0	1
	0	1	3
Média \pm Desvio-padrão	2,4 \pm 2,88	1,40 \pm 1,14	1,40 \pm 1,14

Teste de Kruskal-Wallis, Dunn ($P < 0,05$)

c) BlueM[®] Gel

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação por BlueM[®] Gel estão demonstrados no gráfico (Figura 14) e descritos (Tabela 4) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os tratamentos de superfície. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 14 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação por BlueM[®] Gel.



As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com as superfícies usinadas, com microtopografia e com microtopografia associada a nanotopografia. Superfícies tratadas: Usinado; Micro: Microtopografia; Nano: Microtopografia associada a nanotopografia. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos das superfícies avaliadas.

Tabela 4 - Média do Número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [$\times 10^{-1}$] encontradas em cada superfície após descontaminação por BlueM® Gel.

Tratamento de Superfície	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
Agente de Descontaminação			
BlueM® Gel	1	7	2
	29,33	8	1,67
	1	22,33	1
	7	3	5
	13	4	6
Média±Desvio-padrão	10,27 ± 11,76	8,73±7,88	3,13±2,22

Teste de Kruskal-Wallis, Dunn (P<0,05)

d) Digluconato de Clorexidina Gel 2%

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação por digluconato de clorexidina gel 2% estão descritos (Tabela 5) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os tratamentos de superfície. Em todos os grupos o valor de UFCs encontradas após descontaminação foi nulo.

Tabela 5 - Média do Número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [$\times 10^{-1}$] encontradas em cada superfície após descontaminação por Digluconato de Clorexidina Gel 2%.

Tratamento de Superfície	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
Agente de Descontaminação			
Digluconato de Clorexidina Gel 2%	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
Média	0	0	0

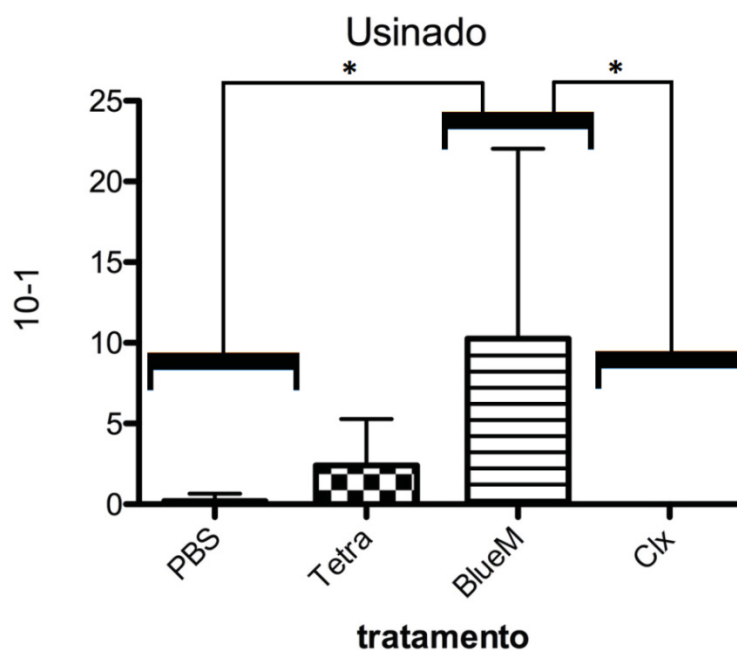
Teste de Kruskal-Wallis, Dunn (P<0,05)

4.5.2 ANÁLISE POR TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE

a) Usinados

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação dos discos de titânio com tratamento de superfície usinados estão demonstrados no gráfico (Figura 15) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os grupos de descontaminação. A avaliação intergrupos demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo BlueM[®] e o grupo Clorexidina, e entre o grupo BlueM[®] e o grupo PBS 1x. Não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Figura 15 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície usinada.

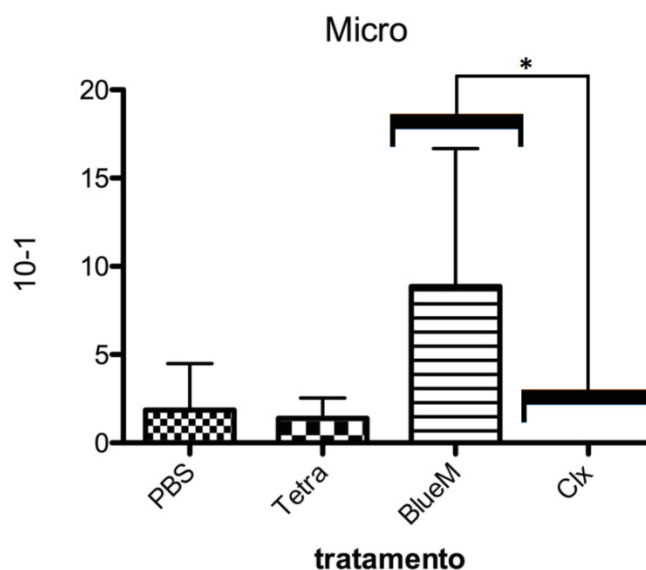


As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com o agente de descontaminação: PBS 1x, Tetraciclina Pasta, BlueM Gel e Clorexidina Gel 2%. Superfícies tratadas: Usinado. PBS: PBS 1x, Tetra: Tetraciclina Pasta, BlueM: BlueM Gel e Clx: Clorexidina Gel 2%. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). Os asteriscos (*) representam as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

b) Microtopografia

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação dos discos de titânio com tratamento de superfície com microtopografia estão demonstrados no gráfico (Figura 16) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os grupos de descontaminação. A avaliação intergrupos demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo BlueM[®] e o grupo Clorexidina. Não foram apresentadas diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Figura 16 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície de microtopografia.

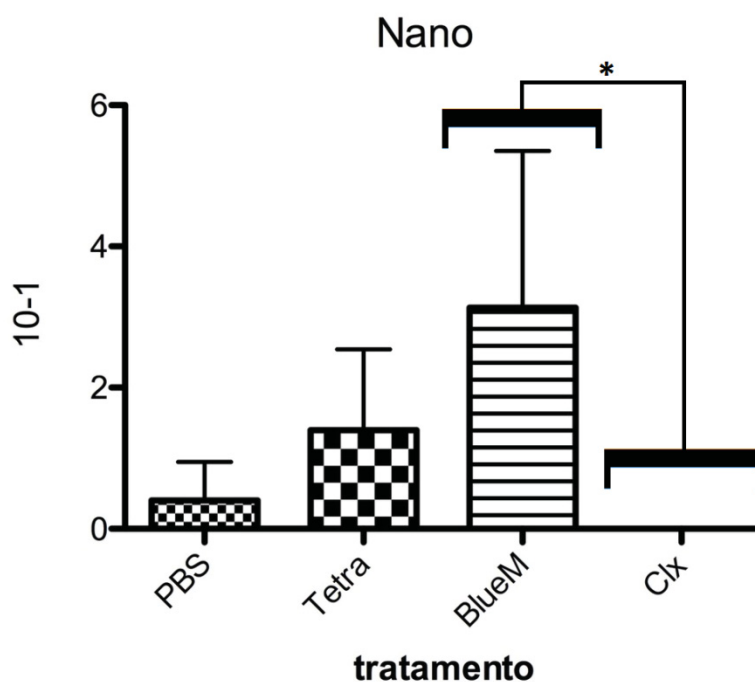


As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com o agente de descontaminação: PBS 1x, Tetraciclina Pasta, BlueM Gel e Clorexidina Gel 2%. Superfície tratada: Micro: Microtopografia. PBS: PBS 1x, Tetra: Tetraciclina Pasta, BlueM: BlueM Gel e Clx: Clorexidina Gel 2%. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). O asterisco (*) representa as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

c) Microtopografia associada a Nanotopografia

Os resultados obtidos através da análise quantitativa visual das UFCs após descontaminação dos discos de titânio com tratamento de superfície com microtopografia estão demonstrados no gráfico (Figura 17) através dos valores de média \pm desvio-padrão de acordo com os grupos de descontaminação. A avaliação intergrupos demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre o grupo BlueM[®] e o grupo Clorexidina. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Figura 17 - Média de contagem ($\times 10^{-1}$) das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após descontaminação sobre os discos com superfície de microtopografia associada a nanotopografia.



As barras representam as médias \pm desvio-padrão das UFCs encontradas de acordo com o agente de descontaminação: PBS 1x, Tetraciclina Pasta, BlueM Gel e Clorexidina Gel 2%. Superfície tratada: Nano: Microtopografia associada a nanotopografia. PBS: PBS 1x, Tetra: Tetraciclina Pasta, BlueM: BlueM Gel e Clx: Clorexidina Gel 2%. $p > 0.05$ e nível de confiança de 95%. (Kruskal-Wallis, Dunn, $p < 0.05$). O asterisco (*) representa as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Do cultivo bacteriano a partir do inóculo dos poços em que se encontravam os discos, foi possível observar macroscopicamente o crescimento de UFC em todas as suspensões coletadas para análise.

4.6 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi comparar os efeitos da descontaminação de discos de titânio com 3 diferentes tratamentos de superfície (usinada, microtopografia e microtopografia associada a nanotopografia) por 4 agentes químicos de descontaminação (solução tampão-fosfato 1x, tetraciclina em pasta, digluconato de clorexidina gel 2% e BlueM® gel). Foi determinado que, dentre os agentes testados, o mais efetivo foi o Digluconato de Clorexidina Gel 2% em todas as superfícies, o qual apresenta significativa capacidade de descontaminação quando aplicado por, no mínimo, 60 segundos.

Uma vez em contato com a cavidade bucal, as superfícies dos implantes são colonizadas por bacilos Gram-negativos anaeróbios, bactérias fusiformes e espiroquetas(36-38), podendo ocasionar a inflamação dos tecidos peri-implantares(38, 39).

O *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tem sido encontrado na maioria dos estudos que tiveram como objetivo identificar essa microbiota peri-implantar em casos de doença(8, 40-42). Além do mais, alguns estudos conseguiram demonstrar o potencial de infiltração em gaps implante-pilar sem carga, representando um alto potencial de colonização e, em implantes de titânio, a capacidade destas bactérias de permitir o desenvolvimento de biofilme parece independe da rugosidade superficial, contudo superfícies mais rugosas demonstraram maior acúmulo (43,44). Em um estudo *in vivo*, Freire et. al.(7)

instalaram superfícies modificadas e contaminadas em ratos, resultando na ocorrência de sangramento espontâneo, ulceração e necrose dos tecidos moles adjacentes após 3 semanas, além de hiperplasia e instabilidade dos implantes após 6 semanas, acompanhada de reabsorção óssea peri-implantar. Esses achados demonstraram que superfícies de titânio modificadas e contaminadas por A.a. podem ser usadas como substrato para adesão, permitindo a proliferação bacteriana e a resposta inflamatória do hospedeiro quando trabalhada *in vivo*.

Baseado nestas informações, neste estudo foi definido que o desafio bacteriano utilizado para avaliar as terapias de descontaminação das superfícies de titânio por agentes químicos seria desenvolvido sob a forma de monoespécie de A.a. As bactérias foram cultivadas sobre as amostras de titânio por um período de 48 horas, tempo similar ao utilizado por trabalhos com propostas semelhantes ao presente estudo (45, 46). Assim, nesse período tem-se contaminação bacteriana adequada para formação de biofilme monoespécie utilizado para os experimentos. Burgers et al. (47), quando avaliaram a descontaminação de discos de titânio contaminados por monoculturas de *S. epidermidis*, *S. sanguinis* e *C. albicans*, observaram que nenhum agente de descontaminação avaliado foi significativamente eficiente contra os agentes bacterianos testados. De forma geral, resultados de estudos *in vitro* com biofilmes monoespécie podem ser utilizados para interpretação de interações mais complexas de biofilmes *in vivo* (47).

Segundo Teughels et al.(4), além de sua composição química, a rugosidade superficial do implante tem impacto significativo na quantidade e qualidade do biofilme formado. Superfícies rugosas e aquelas que apresentam

maior energia livre superficial (como no caso do titânio) tendem a acumular mais biofilme. Além disso, a adesão bacteriana inicial começa em áreas hidrofílicas e dentro das cavidades e sulcos das superfícies ásperas, de onde é difícil se eliminar micro-organismos.

Denisson et. al. (48) observaram a relação entre o tratamento de superfícies dos implantes e os protocolos de descontaminação. Os implantes utilizados no estudo eram usinados, pulverizados com plasma de titânio ou revestidos com hidroxiapatita. Os implantes receberam descontaminação através de bolinha de algodão embebida em água, solução de ácido cítrico, solução digluconato de clorexidina 0.12% ou um jato abrasivo de pó/água/ar, todas por aplicação única em um período de 60 segundos. Na avaliação dos tratamentos, observou-se que os implantes usinados obtiveram maior sucesso na descontaminação em comparação com as demais superfícies para todos os agentes. Apesar de metodologia similar, tal resultado não foi observado na presente análise, onde não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as superfícies incluídas no estudo.

Albrektsson e Wennerberg (2004)(49) sugeriram uma classificação da rugosidade das superfícies de titânio de acordo com o valor Sa (desvio médio aritmético da altura de um plano médio), sendo as superfícies lisas aquelas com Sa de até 0,5 μm ; superfícies minimamente ásperas foram identificadas com um Sa de 0,5-1 μm , superfícies moderadamente ásperas com Sa 1–2 μm e superfícies rugosas com um Sa de >2 μm . Estes parâmetros de superfície foram seguidos por Schwartz-Filho et al. (50), ao analisar os mesmos discos utilizados no presente estudo obtendo média \pm desvio-padrão, e classificaram os discos usinados como superfície lisa (0.28 \pm 0.02), microtopografia como superfície

minimamente áspera (0.57 ± 0.05) e microtopografia associada a nanotopografia como superfície minimamente áspera (0.61 ± 0.05).

O tratamento macro ou nanoestrutural da superfície dos implantes é realizado para proporcionar melhor osseointegração (51-53), porém dificulta a descontaminação mecânica da superfície dos implantes (47), especialmente em superfícies mais rugosas (4, 48). Superfícies lisas, apesar de apresentarem melhores resultados após descontaminação, apresentam menores taxas de reosseointegração, de forma que as características das superfícies estão diretamente relacionadas à taxa de osseointegração (54), enquanto que superfícies com maior rugosidade apresentam melhores índices de sucesso após tratamento da peri-implantite (51). Como existem divergências sobre qual tratamento de superfície seria o mais indicado para as especificidades de cada terapia de reabilitação, mais estudos comparando seus efeitos biológicos e microbiológicos se fazem necessários.

Considerando-se a relação entre a superfície contaminada dos implantes e a necessidade do tratamento superficial para que ocorra a formação das estruturas de suporte e proteção dos implantes, a descontaminação se faz necessária (55). A descontaminação química, uma das opções possíveis, envolve o uso localizado de substâncias antimicrobianas, tais como: clorexidina, tetraciclina ou minociclina, ácido cítrico, peróxido de hidrogênio, ácido fosfórico, entre outros (23, 56). As comparações observando a eficácia de diferentes agentes químicos tem sido realizadas principalmente sob forma *in vitro* e sobre diferentes superfícies de implante (17) e, embora existam diversos estudos realizando esta análise, ainda não há consenso sobre qual o melhor método de

descontaminação a ser utilizado e a determinação de um padrão-ouro para a desinfecção (32, 33), justificando assim a presente proposição avaliativa.

No presente estudo as substâncias químicas foram selecionadas a fim de observar vertentes diferentes das encontradas na literatura, sendo uma utilizada como controle químico positivo (digluconato de clorexidina gel 2%), outra como controle químico negativo (solução tampão-fosfato 1x), outra como agente químico com aplicação clínica corriqueira (tetraciclina pasta 50 mg/ml) e uma como agente químico com recente lançamento no mercado (BlueM[®] gel), sendo em todas as situações a aplicação feita por método ativo, durante 60 segundos. O tempo foi baseado em estudo prévio de Waal et al. (57), realizado para investigar o efeito da descontaminação da superfície de implantes com solução de digluconato de clorexidina 0,12% (CHX) / cloreto de cetilpiridínio 0,05% (CPC) em parâmetros microbiológicos e clínicos. Em estudo piloto realizado previamente à pesquisa, observou-se que a forma farmacêutica de gel em concentração 2%, quando aplicado em discos com microtopografia, apresentou melhores resultados na descontaminação de *E. coli* quando comparados a solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, sendo então a forma eleita para a presente avaliação.

No tratamento não cirúrgico da peri-implantite, a terapia mecânica por si só não parece ser suficiente (58). Quando usada em combinação com a clorexidina, melhora ligeiramente os parâmetros clínicos e microbiológicos, e a adição de administração local ou sistêmica de antibióticos reduz o sangramento à sondagem (59, 60). Os presentes resultados a demonstraram a superioridade do gel de Digluconato de Clorexidina 2% em comparação com os demais

agentes químicos e apresentou diferença estatisticamente significativa com o grupo tratado por BlueM® Gel em todas as superfícies analisadas.

O digluconato de clorexidina possui atividade antibacteriana de amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras. O modo de ação antibacteriano se dá através da alteração da membrana celular bacteriana, o que resulta em um extravasamento do conteúdo interno acarretando em morte celular (61).

De acordo com o fabricante, o gel oral BlueM® (cód. OGI15) utilizado neste estudo é composto pelos seguintes ingredientes: água, álcool, glicerina, sílica, sacarina de sódio, perborato de sódio, ácido cítrico, PEG-32, gluconato de sódio, lactoferrina, goma xantana, goma celulósica. Tem como indicação o tratamento de: sangramento nas gengivas; periodontite ou peri-implantite; ferimentos decorrentes da extração de implantes; ferimentos causados pela quimioterapia e radioterapia; ferimentos ocasionados por próteses; bolsas ao redor dos dentes e implantes. Seu mecanismo de ação se dá através da liberação significativa de doses de oxigênio na região aplicada. Sua posologia indicada é de 3 aplicações diárias na região contaminada ou conforme orientação do cirurgião-dentista. Isto pode justificar os menores níveis de descontaminação encontrados nesta pesquisa, quando comparados aos demais agentes químicos, tendo em vista a aplicação em momento único da substância. Makeeva et al. (62) observaram 110 pacientes com doença coronária quanto a higiene bucal e alterações inflamatórias da mucosa oral e doenças periodontais. Em 100% dos casos, foi julgado necessário realizar treinamento sobre cuidados higiênicos bucais adequados. A inclusão do creme dental e enxaguatório bucal

BlueM[®] na higiene bucal complexa reduziu a gravidade das alterações inflamatórias e melhorou o estado higiênico da cavidade oral.

Romeo et al. (63) demonstraram em estudo clínico randomizado o efeito superior de descontaminação da pasta de tetraciclina na concentração (50 mg/ml) aplicada durante 3 minutos quando comparado com tratamento mecânico apenas. Dostie et al. (64) encontraram resultados semelhantes ao analisar pasta de tetraciclina associada a NaCl observando, no entanto, remanescentes de bactérias viáveis após descontaminação de discos de titânio. Contudo, a fim de padronizar o tempo de aplicação executado no presente estudo, o tempo utilizado foi de 1 minuto, podendo explicar os resultados inferiores obtidos se comparados aos demais agentes de descontaminação.

A solução tampão fosfato-salino 1x (PBS) foi utilizada no presente estudo a fim de estabelecer um controle químico negativo, na tentativa de observar se o tratamento mecânico associado a um líquido sem atividade antimicrobiana teria capacidade de descontaminar superficialmente o titânio. Com os resultados apresentados foi possível observar que a utilização de PBS não foi suficiente para eliminar as UFCs da superfície nos 3 tipos de tratamento. Todavia, apresentou, no geral, resultados superiores se comparado ao grupo Tetraciclina Pasta e BlueM[®]. Diferentes estudos foram realizados utilizando controles negativos e, com este fim, diversas substâncias tem sido utilizadas, como: PBS, H₂O e Solução Salina Estéril (51, 65, 66).

Respeitando as limitações do presente estudo, principalmente com base no uso de uma única espécie bacteriana e análise exclusiva *in vitro*, outros estudos deverão ser conduzidos para observar a eficiência clínica de agentes de

descontaminação como Clorexidina Gel a 2%, Tetraciclina Pasta e BlueM[®] Gel no tratamento de doenças peri-implantares.

4.7 CONCLUSÕES

Dentre os limites metodológicos deste estudo, pode-se concluir que: entre as superfícies descontaminadas por digluconato de clorexidina gel a 2% foi observada eliminação completa das UFC; o digluconato de clorexidina gel a 2% foi estatisticamente superior ao grupo BlueM[®] em se tratando de superfícies de titânio contaminadas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, independente da rugosidade das superfícies; as superfícies não apresentaram influência nos resultados dos métodos de descontaminação avaliados; mais estudos se fazem necessários a fim de observar clinicamente o efeito dos agentes químicos de descontaminação relacionados a peri-implantite.

4.8 REFERÊNCIAS

1. Meffert RM, Langer B, Fritz ME. Dental implants: a review. *Journal of periodontology*. 1992;63(11):859-70.
2. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects. *Clinical implant dentistry and related research*. 2012;14(2):170-83.
3. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology 2000*. 2010;53:167-81.
4. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical oral implants research*. 2006;17 Suppl 2:68-81.
5. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximenez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro. *Clinical oral implants research*. 2012;23(3):301-7.
6. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of periodontology*. 2018;89 Suppl 1:S1-S8.
7. Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, et al. Development of an animal model for *Aggregatibacter*

- actinomycetemcomitans biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *Journal of periodontology*. 2011;82(5):778-89.
8. Zhuang LF, Watt RM, Mattheos N, Si MS, Lai HC, Lang NP. Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues. *Clinical oral implants research*. 2016;27(1):13-21.
 9. Speelman JA, Collaert B, Klinge B. Evaluation of different methods to clean titanium abutments. A scanning electron microscopic study. *Clinical oral implants research*. 1992;3(3):120-7.
 10. Brookshire FV, Nagy WW, Dhuru VB, Ziebert GJ, Chada S. The qualitative effects of various types of hygiene instrumentation on commercially pure titanium and titanium alloy implant abutments: an in vitro and scanning electron microscope study. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1997;78(3):286-94.
 11. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology 2000*. 1998;17:63-76.
 12. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clinical oral implants research*. 2000;11 Suppl 1:146-55.
 13. Suh JJ, Simon Z, Jeon YS, Choi BG, Kim CK. The use of implantoplasty and guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis: two case reports. *Implant dentistry*. 2003;12(4):277-82.
 14. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant diseases. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2004;19 Suppl:128-39.
 15. Schou S, Berglundh T, Lang NP. Surgical treatment of peri-implantitis. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2004;19 Suppl:140-9.
 16. Schwarz F, John G, Schmucker A, Sahm N, Becker J. Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination: a 7-year follow-up observation. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(3):337-42.
 17. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Sola-Ruiz MF, Ferrer-Garcia JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2013;18(6):e869-76.
 18. Schenk G, Flemmig TF, Betz T, Reuther J, Klaiber B. Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series. *Clinical oral implants research*. 1997;8(5):427-33.
 19. Parma-Benfenati S, Roncati M, Galletti P, Tinti C. Peri-implantitis Treatment with a Regenerative Approach: Clinical Outcomes on Reentry. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2015;35(5):625-36.
 20. Zablotsky M, Meffert R, Mills O, Burgess A, Lancaster D. The macroscopic, microscopic and spectrometric effects of various chemotherapeutic agents on the plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implant surface. *Clinical oral implants research*. 1992;3(4):189-98.
 21. Zablotsky M. HA coatings in implant dentistry: hype, hysteria, or clinical reality? *The Journal of dental symposia*. 1993;1:70-2.
 22. Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Persson GR, Renvert S. Long-term stability of surgical bone regenerative procedures of peri-implantitis lesions in a

- prospective case-control study over 3 years. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(6):590-7.
23. Subramani K, Wismeijer D. Decontamination of titanium implant surface and re-osseointegration to treat peri-implantitis: a literature review. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2012;27(5):1043-54.
 24. Al-Hashedi AA, Laurenti M, Benhamou V, Tamimi F. Decontamination of titanium implants using physical methods. *Clinical oral implants research*. 2017;28(8):1013-21.
 25. Schwarz F, Sculean A, Romanos G, Hertzen M, Horn N, Scherbaum W, et al. Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants. *Clinical oral investigations*. 2005;9(2):111-7.
 26. Schwarz F, Nuesry E, Bieling K, Hertzen M, Becker J. Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces. *Journal of periodontology*. 2006;77(11):1820-7.
 27. Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(4):283-9.
 28. Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(4):290-5.
 29. Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(4):296-301.
 30. Lindhe J, Meyle J, Group DoEWoP. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(8 Suppl):282-5.
 31. Rocuzzo M, Bonino F, Bonino L, Dalmaso P. Surgical therapy of peri-implantitis lesions by means of a bovine-derived xenograft: comparative results of a prospective study on two different implant surfaces. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(8):738-45.
 32. Claffey N, Clarke E, Polyzois I, Renvert S. Surgical treatment of peri-implantitis. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(8 Suppl):316-32.
 33. Schwarz F, Sahm N, Mihatovic I, Golubovic V, Becker J. Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2011;38(10):939-49.
 34. Roos-Jansaker AM, Renvert S, Egelberg J. Treatment of peri-implant infections: a literature review. *Journal of clinical periodontology*. 2003;30(6):467-85.
 35. Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;40(2):324-35.
 36. Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral microbiology and immunology*. 1988;3(3):113-20.
 37. Van de Velde T, Collaert B, Sennerby L, De Bruyn H. Effect of implant design on preservation of marginal bone in the mandible. *Clinical implant dentistry and related research*. 2010;12(2):134-41.

38. Lombardo G, Corrocher G, Pighi J, Mascellaro A, Marincola M, Nocini PF. Esthetic Outcomes of Immediately Loaded Locking Taper Implants in the Anterior Maxilla: A Case Series Study. *Journal of Oral Implantology*. 2016;42(3):258-64.
39. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Piscoer M, Y IJ, Van der Velden U. Plaque removal by professional electric toothbrushing compared with professional polishing. *Journal of clinical periodontology*. 2004;31(10):903-7.
40. van Winkelhoff AJ, Wolf JW. Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(7):531-5.
41. Cosgarea R, Dannewitz B, Sculean A, Bran S, Rotaru H, Baciut G, et al. Bacterial and inflammatory behavior of implants in the early healing phase of chronic periodontitis. *Quintessence International*. 2012;43(6):491-501.
42. Cortelli SC, Cortelli JR, Shang H, McGuire JA, Charles CA. Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial. *American journal of dentistry*. 2013;26(3):149-55.
43. Nascimento MM, Gordan VV, Qvist V, Bader JD, Rindal DB, Williams OD, et al. Restoration of noncarious tooth defects by dentists in The Dental Practice-Based Research Network. *Journal of the American Dental Association*. 2011;142(12):1368-75.
44. Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clinical oral implants research*. 2016;27(10):1243-50.
45. Saffarpour A, Nozari A, Fekrazad R, Saffarpour A, Heibati MN, Iranparvar K. Microstructural Evaluation of Contaminated Implant Surface Treated by Laser, Photodynamic Therapy, and Chlorhexidine 2 percent. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2018;33(5):1019-26.
46. Moslemi N, Soleiman-Zadeh Azar P, Bahador A, Rouzmeh N, Chiniforush N, Paknejad M, et al. Inactivation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*. 2015;30(1):89-94.
47. Burgers R, Wittey C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on Staphylococcus epidermidis, Candida albicans, and Streptococcus sanguinis. *Archives of oral biology*. 2012;57(7):940-7.
48. Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Caffesse RG. Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination. *Journal of periodontology*. 1994;65(10):942-8.
49. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2009;20 Suppl 4:172-84.
50. Schwartz-Filho HO, Morandini AC, Ramos-Junior ES, Jimbo R, Santos CF, Marcantonio E, Jr., et al. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2012;100(10):2629-36.

51. Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*. 2001;12(6):595-603.
52. Herr AE, Hatch AV, Throckmorton DJ, Tran HM, Brennan JS, Giannobile WV, et al. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(13):5268-73.
53. Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *Journal of clinical periodontology*. 2012;39(2):182-7.
54. Parlar A, Bosshardt DD, Cetiner D, Schafroth D, Unsal B, Haytac C, et al. Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis. *Clinical oral implants research*. 2009;20(4):391-9.
55. Meffert RM. Guided tissue regeneration/guided bone regeneration: a review of the barrier membranes. *Practical periodontics & aesthetic dentistry*. 1996;8(2):142-4.
56. Valderrama P, Wilson TG, Jr. Detoxification of implant surfaces affected by peri-implant disease: an overview of surgical methods. *International Journal of Dentistry*. 2013;2013:740680.
57. de Waal YC, Raghoobar GM, Huddleston Slater JJ, Meijer HJ, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Implant decontamination during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(2):186-95.
58. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clinical oral implants research*. 2005;16(3):288-93.
59. Salvi GE, Persson GR, Heitz-Mayfield LJ, Frei M, Lang NP. Adjunctive local antibiotic therapy in the treatment of peri-implantitis II: clinical and radiographic outcomes. *Clinical oral implants research*. 2007;18(3):281-5.
60. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *Journal of clinical periodontology*. 2008;35(8 Suppl):305-15.
61. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology 2000*. 2002;28:72-90.
62. Makeeva IM, Tambovtseva NV. [Applying toothpaste and mouthwash BLUEM in complex oral care in patients with coronary heart disease]. *Stomatologiya (Mosk)*. 2014;93(3):18-20.
63. Romeo E, Ghisolfi M, Murgolo N, Chiapasco M, Lops D, Vogel G. Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: clinical outcome. *Clinical oral implants research*. 2005;16(1):9-18.
64. Dostie S, Alkadi LT, Owen G, Bi J, Shen Y, Haapasalo M, et al. Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(4):403-9.
65. Wiedmer D, Petersen FC, Lonn-Stensrud J, Tiainen H. Antibacterial effect of hydrogen peroxide-titanium dioxide suspensions in the decontamination of rough titanium surfaces. *Biofouling*. 2017;33(6):451-9.

66. Henderson E, Schneider S, Petersen FC, Haugen HJ, Wohlfahrt JC, Ekstrand K, et al. Chemical debridement of contaminated titanium surfaces: an in vitro study. *Acta odontologica Scandinavica*. 2013;71(3-4):957-64.

5. CONCLUSÕES

Dentre os limites metodológicos deste estudo, pode-se concluir que:

- Entre as superfícies descontaminadas por digluconato de clorexidina gel a 2% foi observada eliminação completa das UFC.
- O digluconato de clorexidina gel a 2% foi estatisticamente superior ao grupo BlueM[®] em se tratando de superfícies de titânio contaminadas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, independente da rugosidade das superfícies.
- As superfícies não apresentaram influência nos resultados dos métodos de descontaminação avaliados.
- Mais estudos se fazem necessários a fim de observar clinicamente o efeito dos agentes químicos de descontaminação relacionados a peri-implantite.

6. REFERÊNCIAS

- AL-HASHEDI, A. A., M. LAURENTI, V. BENHAMOU, AND F. TAMIMI. 2017. 'Decontamination of titanium implants using physical methods', *Clin Oral Implants Res*, 28: 1013-21.
- AL-RADHA, A. S., A. PAL, A. P. PETTEMERIDES, AND H. F. JENKINSON. 2012. 'Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases', *J Dent*, 40: 989-98.
- ALBOUY, J. P., I. ABRAHAMSSON, AND T. BERGLUNDH. 2012. 'Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs', *J Clin Periodontol*, 39: 182-7.
- ALBREKTSSON, T. O., C. B. JOHANSSON, AND L. SENNERBY. 1994. 'Biological aspects of implant dentistry: osseointegration', *Periodontol 2000*, 4: 58-73.
- ALBREKTSSON, T., AND A. WENNERBERG. 2005. 'The impact of oral implants - past and future, 1966-2042', *J Can Dent Assoc*, 71: 327.
- ALMAGUER-FLORES, A., R. OLIVARES-NAVARRETE, M. WIELAND, L. A. XIMENEZ-FYVIE, Z. SCHWARTZ, AND B. D. BOYAN. 2012. 'Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces in vitro', *Clin Oral Implants Res*, 23: 301-7.
- AMARASINGHE, J. J., F. A. SCANNAPIECO, AND E. M. HAASE. 2009. 'Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation', *Infect Immun*, 77: 2896-907.
- BROOKSHIRE, F. V., W. W. NAGY, V. B. DHURU, G. J. ZIEBERT, AND S. CHADA. 1997. 'The qualitative effects of various types of hygiene instrumentation on commercially pure titanium and titanium alloy implant abutments: an in vitro and scanning electron microscope study', *J Prosthet Dent*, 78: 286-94.
- BURGERS, R., C. WITECY, S. HAHNEL, AND M. GOSAU. 2012. 'The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*', *Arch Oral Biol*, 57: 940-7.
- CANULLO, L., M. TALLARICO, S. RADOVANOVIC, B. DELIBASIC, U. COVANI, AND M. RAKIC. 2016. 'Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis', *Clin Oral Implants Res*, 27: 1243-50.
- CATON, J. G., G. ARMITAGE, T. BERGLUNDH, I. L. C. CHAPPLE, S. JEPSEN, K. S. KORNMAN, B. L. MEALEY, P. N. PAPAPANOU, M. SANZ, AND M. S. TONETTI. 2018. 'A new classification scheme for periodontal and peri-implant

diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification', *J Periodontol*, 89 Suppl 1: S1-S8.

CHARALAMPAKIS, G., AND G. N. BELIBASAKIS. 2015. 'Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses', *Virulence*, 6: 183-7.

CLAFFEY, N., E. CLARKE, I. POLYZOIS, AND S. RENVERT. 2008. 'Surgical treatment of peri-implantitis', *J Clin Periodontol*, 35: 316-32.

CORTELLI, S. C., J. R. CORTELLI, H. SHANG, J. A. MCGUIRE, AND C. A. CHARLES. 2013. 'Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial', *Am J Dent*, 26: 149-55.

COSGAREA, R., B. DANNEWITZ, A. SCULEAN, S. BRAN, H. ROTARU, G. BACIUT, AND S. EICK. 2012. 'Bacterial and inflammatory behavior of implants in the early healing phase of chronic periodontitis', *Quintessence Int*, 43: 491-501.

DAVIES, J. E. 1998. 'Mechanisms of endosseous integration', *Int J Prosthodont*, 11: 391-401.

DE OLIVEIRA, P. T., AND A. NANJI. 2004. 'Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells', *Biomaterials*, 25: 403-13.

DE WAAL, Y. C., G. M. RAGHOEBAR, J. J. HUDDLESTON SLATER, H. J. MEIJER, E. G. WINKEL, AND A. J. VAN WINKELHOFF. 2013. 'Implant decontamination during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial', *J Clin Periodontol*, 40: 186-95.

DENNISON, D. K., M. B. HUERZELER, C. QUINONES, AND R. G. CAFFESSE. 1994. 'Contaminated implant surfaces: an in vitro comparison of implant surface coating and treatment modalities for decontamination', *J Periodontol*, 65: 942-8.

DERKS, J., C. TOMASI, J. L. WENNSTROM, AND T. BERGLUNDH. 2015. 'Response to Letter to the Editor, "Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Early and Late Implant Loss"', *J Dent Res*, 94: 234S.

DEVIDES, S. L., AND A. T. FRANCO. 2006. 'Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21: 262-9.

DOSTIE, S., L. T. ALKADI, G. OWEN, J. BI, Y. SHEN, M. HAAPASALO, AND H. S. LARJAVA. 2017. 'Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm', *J Clin Periodontol*, 44: 403-09.

FREIRE, M. O., P. P. SEDGHIZADEH, C. SCHAUDINN, A. GORUR, J. S. DOWNEY, J. H. CHOI, W. CHEN, J. K. KOOK, C. CHEN, S. D. GOODMAN,

AND H. H. ZADEH. 2011. 'Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study', *J Periodontol*, 82: 778-89.

GALASSI, F., W. E. KAMAN, D. ANSSARI MOIN, J. VAN DER HORST, D. WISMEIJER, W. CRIELAARD, M. L. LAINE, E. C. VEERMAN, F. J. BIKKER, AND B. G. LOOS. 2012. 'Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections', *J Periodontal Res*, 47: 616-25.
Heitz-Mayfield, L. J., and N. P. Lang. 2004. 'Antimicrobial treatment of peri-implant diseases', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19 Suppl: 128-39.

HEITZ-MAYFIELD, L. J., AND N. P. LANG. 2004. 'Antimicrobial treatment of peri-implant diseases', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19 Suppl: 128-39.

———. 2010. 'Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis', *Periodontol 2000*, 53: 167-81.

HENDERSON, E., S. SCHNEIDER, F. C. PETERSEN, H. J. HAUGEN, J. C. WOHLFAHRT, K. EKSTRAND, AND A. EKFIELDT. 2013. 'Chemical debridement of contaminated titanium surfaces: an in vitro study', *Acta Odontol Scand*, 71: 957-64.

HERR, A. E., A. V. HATCH, D. J. THROCKMORTON, H. M. TRAN, J. S. BRENNAN, W. V. GIANNOBILE, AND A. K. SINGH. 2007. 'Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 5268-73.

JIMBO, R., J. SOTRES, C. JOHANSSON, K. BREDING, F. CURRIE, AND A. WENNERBERG. 2012. 'The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces', *Clin Oral Implants Res*, 23: 706-12.

KARRING, E. S., A. STAVROPOULOS, B. ELLEGAARD, AND T. KARRING. 2005. 'Treatment of peri-implantitis by the Vector system', *Clin Oral Implants Res*, 16: 288-93.

LANG, N. P., T. G. WILSON, AND E. F. CORBET. 2000. 'Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment', *Clin Oral Implants Res*, 11 Suppl 1: 146-55.

LINDHE, J., J. MEYLE, AND D. of European Workshop on Periodontology Group. 2008. 'Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology', *J Clin Periodontol*, 35: 282-5.

LISTGARTEN, M. A. 1997. 'Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation', *Ann Periodontol*, 2: 299-313.

LOMBARDO, G., G. CORROCHER, J. PIGHI, A. MASCELLARO, M. MARINCOLA, AND P. F. NOCINI. 2016. 'Esthetic Outcomes of Immediately

Loaded Locking Taper Implants in the Anterior Maxilla: A Case Series Study', *J Oral Implantol*, 42: 258-64.

MAKEEVA, I. M., AND N. V. TAMBOVTSEVA. 2014. '[Applying toothpaste and mouthwash BLUEM in complex oral care in patients with coronary heart disease]', *Stomatologija (Mosk)*, 93: 18-20.

MEFFERT, R. M. 1996. 'Guided tissue regeneration/guided bone regeneration: a review of the barrier membranes', *Pract Periodontics Aesthet Dent*, 8: 142-4.

MEFFERT, R. M., B. LANGER, AND M. E. FRITZ. 1992. 'Dental implants: a review', *J Periodontol*, 63: 859-70.

MELLADO-VALERO, A., P. BUITRAGO-VERA, M. F. SOLA-RUIZ, AND J. C. FERRER-GARCIA. 2013. 'Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18: e869-76.

MOMBELLI, A., D. BUSER, AND N. P. LANG. 1988. 'Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results', *Oral Microbiol Immunol*, 3: 113-20.

MOMBELLI, A., AND F. DECAILLET. 2011. 'The characteristics of biofilms in peri-implant disease', *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11: 203-13.

MOMBELLI, A., AND N. P. LANG. 1998. 'The diagnosis and treatment of peri-implantitis', *Periodontol 2000*, 17: 63-76.

MOMBELLI, A., M. A. VAN OOSTEN, E. SCHURCH, JR., AND N. P. LAND. 1987. 'The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants', *Oral Microbiol Immunol*, 2: 145-51.

MOSLEMI, N., P. SOLEIMAN-ZADEH AZAR, A. BAHADOR, N. ROUZMEH, N. CHINIFORUSH, M. PAKNEJAD, AND R. FEKRAZAD. 2015. 'Inactivation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by two different modalities of photodynamic therapy using Toluidine blue O or Radachlorin as photosensitizers: an in vitro study', *Lasers Med Sci*, 30: 89-94.

MOUHYI, J., D. M. DOHAN EHRENFEST, AND T. ALBREKTSSON. 2012. 'The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects', *Clin Implant Dent Relat Res*, 14: 170-83.

NANCI, A., J. D. WUEST, L. PERU, P. BRUNET, V. SHARMA, S. ZALZAL, AND M. D. MCKEE. 1998. 'Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules', *J Biomed Mater Res*, 40: 324-35.

NASCIMENTO, M. M., V. V. GORDAN, V. QVIST, J. D. BADER, D. B. RINDAL, O. D. WILLIAMS, D. GEWARTOWSKI, J. L. FELLOWS, M. S. LITAKER, G. H. GILBERT, AND GROUP DENTAL PRACTICE-BASED RESEARCH NETWORK

COLLABORATIVE. 2011. 'Restoration of noncarious tooth defects by dentists in The Dental Practice-Based Research Network', *J Am Dent Assoc*, 142: 1368-75.

PAPALEXIOU, V., A. B. NOVAES, JR., M. F. GRISI, S. S. SOUZA, M. TABA, JR., AND J. K. KAJIWARA. 2004. 'Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study', *Clin Oral Implants Res*, 15: 44-53.

PARLAR, A., D. D. BOSSHARDT, D. CETINER, D. SCHAFROTH, B. UNSAL, C. HAYTAC, AND N. P. LANG. 2009. 'Effects of decontamination and implant surface characteristics on re-osseointegration following treatment of peri-implantitis', *Clin Oral Implants Res*, 20: 391-9.

PARMA-BENFENATI, S., M. RONCATI, P. GALLETTI, AND C. TINTI. 2015. 'Peri-implantitis Treatment with a Regenerative Approach: Clinical Outcomes on Reentry', *Int J Periodontics Restorative Dent*, 35: 625-36.

PATEL, R. 2005. 'Biofilms and antimicrobial resistance', *Clin Orthop Relat Res*: 41-7.

PEREZ-CHAPARRO, P. J., P. M. DUARTE, J. A. SHIBLI, S. MONTENEGRO, S. LACERDA HELUY, L. C. FIGUEIREDO, M. FAVERI, AND M. FERES. 2016. 'The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review', *J Periodontol*, 87: 1295-304.

PERSSON, L. G., T. BERGLUNDH, J. LINDHE, AND L. SENNERBY. 2001. 'Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog', *Clin Oral Implants Res*, 12: 595-603.

QUIRYNEN, M., AND M. A. LISTGARTEN. 1990. 'Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark', *Clin Oral Implants Res*, 1: 8-12.

QUIRYNEN, M., W. TEUGHEL, M. DE SOETE, AND D. VAN STEENBERGHE. 2002. 'Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects', *Periodontol 2000*, 28: 72-90.

QUIRYNEN, M., R. VOGELS, M. PAUWELS, A. D. HAFFAJEE, S. S. SOCRANSKY, N. G. UZEL, AND D. VAN STEENBERGHE. 2005. 'Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets', *J Dent Res*, 84: 340-4.

RENVERT, S., A. M. ROOS-JANSKER, AND N. CLAFFEY. 2008. 'Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review', *J Clin Periodontol*, 35: 305-15.

ROCCUZZO, M., F. BONINO, L. BONINO, AND P. DALMASSO. 2011. 'Surgical therapy of peri-implantitis lesions by means of a bovine-derived xenograft: comparative results of a prospective study on two different implant surfaces', *J Clin Periodontol*, 38: 738-45.

ROMEO, E., M. GHISOLFI, N. MURGOLO, M. CHIAPASCO, D. LOPS, AND G. VOGEL. 2005. 'Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: clinical outcome', *Clin Oral Implants Res*, 16: 9-18.

ROOS-JANSKER, A. M., C. LINDAHL, G. R. PERSSON, AND S. RENVERT. 2011. 'Long-term stability of surgical bone regenerative procedures of peri-implantitis lesions in a prospective case-control study over 3 years', *J Clin Periodontol*, 38: 590-7.

ROOS-JANSKER, A. M., C. LINDAHL, H. RENVERT, AND S. RENVERT. 2006a. 'Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors', *J Clin Periodontol*, 33: 283-9.

ROOS-JANSKER, A. M., C. LINDAHL, H. RENVERT, AND S. RENVERT. 2006b. 'Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions', *J Clin Periodontol*, 33: 290-5.

ROOS-JANSKER, A. M., H. RENVERT, C. LINDAHL, AND S. RENVERT. 2006. 'Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions', *J Clin Periodontol*, 33: 296-301.

ROOS-JANSKER, A. M., S. RENVERT, AND J. EGELBERG. 2003. 'Treatment of peri-implant infections: a literature review', *J Clin Periodontol*, 30: 467-85.

ROSENBERG, E. S., J. P. TOROSIAN, AND J. SLOTS. 1991. 'Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants', *Clin Oral Implants Res*, 2: 135-44.

SAFFARPOUR, A., A. NOZARI, R. FEKRAZAD, A. SAFFARPOUR, M. N. HEIBATI, AND K. IRANPARVAR. 2018. 'Microstructural Evaluation of Contaminated Implant Surface Treated by Laser, Photodynamic Therapy, and Chlorhexidine 2 percent', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 33: 1019-26.

SALVI, G. E., G. R. PERSSON, L. J. HEITZ-MAYFIELD, M. FREI, AND N. P. LANG. 2007. 'Adjunctive local antibiotic therapy in the treatment of peri-implantitis II: clinical and radiographic outcomes', *Clin Oral Implants Res*, 18: 281-5.

SCHENK, G., T. F. FLEMMIG, T. BETZ, J. REUTHER, AND B. KLAIBER. 1997. 'Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series', *Clin Oral Implants Res*, 8: 427-33.

SCHOU, S., T. BERGLUNDH, AND N. P. LANG. 2004. 'Surgical treatment of peri-implantitis', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 19 Suppl: 140-9.

SCHWARTZ-FILHO, H. O., A. C. MORANDINI, E. S. RAMOS-JUNIOR, R. JIMBO, C. F. SANTOS, E. MARCANTONIO, JR., A. WENNERBERG, AND R. A.

MARCANTONIO. 2012. 'Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts', *J Biomed Mater Res A*, 100: 2629-36.

SCHWARZ, F., G. JOHN, A. SCHMUCKER, N. SAHM, AND J. BECKER. 2017. 'Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination: a 7-year follow-up observation', *J Clin Periodontol*, 44: 337-42.

SCHWARZ, F., E. NUESRY, K. BIELING, M. HERTEN, AND J. BECKER. 2006. 'Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces', *J Periodontol*, 77: 1820-7.

SCHWARZ, F., N. SAHM, I. MIHATOVIC, V. GOLUBOVIC, AND J. BECKER. 2011. 'Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis', *J Clin Periodontol*, 38: 939-49.

SCHWARZ, F., A. SCULEAN, G. ROMANOS, M. HERTEN, N. HORN, W. SCHERBAUM, AND J. BECKER. 2005. 'Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants', *Clin Oral Investig*, 9: 111-7.

SPEELMAN, J. A., B. COLLAERT, AND B. KLINGE. 1992. 'Evaluation of different methods to clean titanium abutments. A scanning electron microscopic study', *Clin Oral Implants Res*, 3: 120-7.

SUBRAMANI, K., AND D. WISMEIJER. 2012. 'Decontamination of titanium implant surface and re-osseointegration to treat peri-implantitis: a literature review', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 27: 1043-54.

SUH, J. J., Z. SIMON, Y. S. JEON, B. G. CHOI, AND C. K. KIM. 2003. 'The use of implantoplasty and guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis: two case reports', *Implant Dent*, 12: 277-82.

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

TONETTI, M. S., G. P. PRATO, AND P. CORTELLINI. 1996. 'Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery', *J Clin Periodontol*, 23: 548-56.

VALDERRAMA, P., AND T. G. WILSON, JR. 2013. 'Detoxification of implant surfaces affected by peri-implant disease: an overview of surgical methods', *Int J Dent*, 2013: 740680.

VAN DE VELDE, T., B. COLLAERT, L. SENNERBY, AND H. DE BRUYN. 2010. 'Effect of implant design on preservation of marginal bone in the mandible', *Clin Implant Dent Relat Res*, 12: 134-41.

VAN DER WEIJDEN, G. A., M. F. TIMMERMAN, M. PISCAER, I. JZERMAN Y, AND U. VAN DER VELDEN. 2004. 'Plaque removal by professional electric toothbrushing compared with professional polishing', *J Clin Periodontol*, 31: 903-7.

VAN WINKELHOFF, A. J., AND J. W. WOLF. 2000. 'Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report', *J Clin Periodontol*, 27: 531-5.

WENNERBERG, A., AND T. ALBREKTSSON. 2009. 'Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review', *Clin Oral Implants Res*, 20 Suppl 4: 172-84.

WENNERBERG, A., C. HALLGREN, C. JOHANSSON, AND S. DANELLI. 1998. 'A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses', *Clin Oral Implants Res*, 9: 11-9.

WIEDMER, D., F. C. PETERSEN, J. LONN-STENSRUD, AND H. TIAINEN. 2017. 'Antibacterial effect of hydrogen peroxide-titanium dioxide suspensions in the decontamination of rough titanium surfaces', *Biofouling*, 33: 451-59.

ZABLOTSKY, M. 1993. 'HA coatings in implant dentistry: hype, hysteria, or clinical reality?', *J Dent Symp*, 1: 70-2.

ZABLOTSKY, M., R. MEFFERT, O. MILLS, A. BURGESS, AND D. LANCASTER. 1992. 'The macroscopic, microscopic and spectrometric effects of various chemotherapeutic agents on the plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implant surface', *Clin Oral Implants Res*, 3: 189-98.

ZHUANG, L. F., R. M. WATT, N. MATTHEOS, M. S. SI, H. C. LAI, AND N. P. LANG. 2016. 'Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and peri-implant tissues', *Clin Oral Implants Res*, 27: 13-21.

ANEXO 1 – AUTHOR'S GUIDELINES

**Journal of
Biomedical Materials Research**
PART B APPLIED BIOMATERIALS



Edited by: Jeremy Gilbert

Impact factor: 2.674

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2018: 29/80 (Engineering, Biomedical)

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2018: 19/32 (Materials Science, Biomaterials)

Online ISSN: 1552-4981

Author Guidelines

Visit the new Author Services today! Features include:

- **Free access to your article for 10 of your colleagues;** each author of a paper may nominate up to 10 colleagues. This feature is retrospective—even articles already published offer this feature for free colleague access.
- **Access in perpetuity** to your published article.
- **Production tracking** for your article and **easy communication with the Production Editor** via e-mail.
- **A list of your favorite journals** with quick links to the Editorial Board, Aims & Scope, Author Guidelines and if applicable the Online Submission website; journals in which you have tracked production of an article are automatically added to your Favorites.
- Guidelines on **optimizing your article** for maximum discoverability.

Publication Forms

- Permission Request Form

Author Guidelines

*Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials
Information for Contributors*

Aims and Scope

Journal of Biomedical Materials Research Part B: *Applied Biomaterials* is an official journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials. It is a peer-reviewed journal serving the needs of biomaterials professionals who devise, promote, apply, regulate, produce, and market new biomaterials and medical devices. Papers are published on device development, implant retrieval and analysis, manufacturing, regulation of devices, liability and legal issues, standards, reviews of different device areas, and clinical applications. Published manuscripts fit into one of six categories: original research reports, clinical device-related articles, short research and development reports, review, special report, or columns and editorials. Manuscripts from all countries

are invited but must be in English. Authors are not required to be members of a Society for Biomaterials.

Types of Articles Considered for Publication

Original Research Reports: Full-length papers consisting of complete and detailed descriptions of a research problem, the experimental approach, the findings, and appropriate discussion. Findings should represent significant new additions to knowledge.

Clinical Device-Related Articles: Full-length papers addressing such issues as material processing, device construction, regulatory matters, clinical trials, and device retrieval.

Reviews: Scholarly and critical topic-oriented reviews that present a state-of-the-art view. While most reviews are solicited, persons interested in contributing may contact the Editor.

Special Reports: Reports of special topic-oriented symposia, device retrieval protocols, or other special reports not described in the above categories, yet of interest to the applied biomaterials research and development community. Potential contributors should contact the Editor before submitting special reports.

Columns and Editorials: While columns and guest editorials are preponderantly solicited, persons interested in becoming columnists or contributing editorials are encouraged to contact the Editor.

Submission of Manuscripts

Online Submission:

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>. Check for an existing user account. If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account. Follow all instructions.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support using the Get Help Now link in the right corner of any screen.

Upon Acceptance: Manuscript files will now automatically be sent to the publisher for production. It is imperative that files be in the correct format to avoid a delay in the production schedule.

JBMR Part B has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. The Editorial Board asks authors of original reports and reviews to disclose, at the time of submission: (1) any financial or employment arrangements they may have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competitive product; and (2) any grants or contracts

from a government agency, a nonprofit foundation, or a company supporting the preparation of the manuscript or the described research. This information will be available to the reviewers of the manuscript. If the article is accepted for publication, the editor will discuss with the authors the manner in which such information may be communicated to the reader.

At the time of submission, *JBMR Part B* asks authors to certify that all animals utilized in their research were cared for according to the policies and principles established by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Review Process: All original reports and reviews receive critical review by at least two reviewers with expertise in the major subject area of the paper. Reviewers may recommend "Acceptance as is," "Acceptance with modification," or "Rejection." If modification is required, the manuscript is returned to the author(s). The revised manuscript is then re-reviewed by the original reviewers, and even re-revised if necessary. Differences in opinion are resolved by submission either to a third reviewer or the Editor.

Copyright/Licensing

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. **For authors signing the copyright transfer agreement:**

If the Online Open option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing Online Open: If the Online Open option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
 Creative Commons Attribution Non-Commercial –No Derives License OAA
 To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the Online Open option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Organization and File Formats

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. The results and discussion sections must be written separately and cannot be combined. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as Latex. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Original research and short reports should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1. Abbreviations must conform to those listed in Council of Biology Editors' CBE Style Manual, 5th Edition.

When mentioning a material, chemical reagent, instrument, or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is absolutely required, list it in parentheses.

Title Page: List the full title of the paper and each author's full name (first name, middle initial(s), surname), department, institution, city, and state (and country if other than the United States). Indicate the name and address of the author to whom reprint requests should be sent.

Abstract and Keywords: Include an abstract of about 200 words maximum summarizing the aims, findings, and conclusions of the paper. Below the abstract, list five keywords or phrases that best characterize the subject matter of the manuscript.

Running Heads: Supply a short title of no more than 65 characters, including spaces and punctuations, to be used for running head copy.

References: Number references consecutively as they appear in the text. Material accepted for publication but not yet published may be listed in the References, but unpublished observations, personal communications, and material submitted for publication but not yet accepted should be cited parenthetically within the text (and not included among the numbered references). Style references entries using the Council of Biology Editors Style Manual, 5th Edition formats:

For journal articles:

Alexander A, Green WS. Total hip replacements: A second look. *J Soc Biomater* 1989;45:345–366.

For books/chapters:

Ricci JL, Guichet J-M. Total hip replacement: A third look. Cindra AB, Franklin DE, editors. *State of the art orthopaedics*, vol 3, Hips. New York: Wiley; 1988:56–59.

For abstracts:

Davidson GRH. Total hip replacement: A fifth look. *Trans ABCS* 1987;22-341–345.

For presentations:

Goodenough T. Total hip replacement: A sixth look. Presented at the 3rd Annu Mtg Orthop Res Soc, Boston, December 5–7, 1989.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool.)

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution:

The minimum requirements for resolution are:
 1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.
 300 DPI/PPI for picture-only photographs
 600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, PNG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to Rapid Inspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/zwi/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: Color figures are generally printed in the Journal at the author's expense. The publisher will provide cost estimates prior to printing. A limited number of color figures that are of critical importance and that significantly enhance the presentation will be considered for publication at the publisher's expense subject to editorial recommendation. Final decision on publication of color figures will be at the discretion of the Editor. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.