

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANE MARIA RANKEL

AVALIAÇÃO IN VITRO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS NA
DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

CURITIBA

2023

VIVIANE MARIA RANKEL

AVALIAÇÃO IN VITRO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS NA
DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

CURITIBA

2023

Rankel, Viviane Maria

Avaliação *in vitro* de métodos físico-químicos na descontaminação de superfície de titânio [recurso eletrônico] / Viviane Maria Rankel – Curitiba, 2023.
1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

1. Peri-implantite. 2. Osseointegração. 3. Descontaminação. I. Schwartz Filho, Humberto Osvaldo. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.634



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

ATA Nº207

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM ODONTOLOGIA

No dia dez de agosto de dois mil e treze às 14:00 horas, na sala Auditório Galha Azul, Campus Botânico, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrand **VIVIANE MARIA RANKEL**, intitulada: **AVALIAÇÃO IN VITRO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LEANDRO EDUARDO KLÜPPEL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SHELON CRISTINA SOUZA PINTO (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 10 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

15/08/2023 14:46:04.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/08/2023 14:23:05.0

LEANDRO EDUARDO KLÜPPEL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/08/2023 10:22:15.0

SHELON CRISTINA SOUZA PINTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4134 - E-mail: posodonto@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 306718

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 306718



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 ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VIVIANE MARIA RANKEL** intitulada: **AVALIAÇÃO IN VITRO DE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 10 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

15/08/2023 14:46:04.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/08/2023 14:23:05.0

LEANDRO EDUARDO KLÜPPEL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/08/2023 10:22:15.0

SHELON CRISTINA SOUZA PINTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu pai Alvir, minha mãe Sirlene e meu irmão Renato por terem me oferecido condições e educação para me tornar a profissional e pessoa que sou. Hoje finalizo mais uma fase e em todos os passos pude contar com seu apoio. Amo muito vocês.

Ao meu namorado, Guilherme Zen, por ser tão companheiro e atencioso por todo esse tempo. Obrigado por todos os maravilhosos momentos que estamos vivendo juntos e por toda a ajuda. Te amo!

Ao meu orientador, 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. Obrigada pela amizade e por sempre mostrar o caminho com muito respeito e dedicação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná, e a todos os professores do programa pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos. Um agradecimento especial aos professores da Periodontia Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho, Profa. Dra. Geisla Soares, Prof. Dr. João Paulo Steffens e Profa. Dra. Reila Tainá Mendes pelos ensinamentos compartilhados.

Aos colegas do Mestrado pela parceria dentro e fora do programa. Um carinho para os meus companheiros de Periodontia Matheus e Henrique e às minhas amigas Caroline, Thaís, Natália e Amanda.

Ao colega Wellington Bruno Venâncio pela parceria em todas as etapas do Mestrado. Sua ajuda foi essencial. Valeu o apoio!

Aos técnicos do Centro de Microscopia eletrônica (CEM) da UFPR, pela inestimável colaboração nas análises microscópicas ao ceder estrutura e conhecimento.

À CAPES, pelo suporte financeiro estudantil durante todo o processo, essa ajuda foi sem dúvidas muito importante para minha formação.

E a todos que de alguma forma colaboraram ou apoiaram este trabalho.

RESUMO

A peri-implantite é uma das principais causas de complicações em implantes osseointegrados, caracterizada pela inflamação ao redor do implante levando a uma perda de osso marginal e quando não tratada pode causar falha do implante. Pode ser influenciada por diferentes fatores como tabagismo e diabetes associados a um biofilme oral. Mesmo existindo diversas formas de tratamento, ainda é muito discutido entre autores qual seria a melhor abordagem para a doença. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a descontaminação de superfícies de titânio utilizando um método químico e métodos físicos e também analisar possíveis alterações causadas nas superfícies após tratamentos. Foi realizado um estudo *in vitro* com 25 discos de titânio, submetidos à cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e divididos posteriormente conforme o método de descontaminação, sendo descontaminados com solução tampão-fosfato, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) gel 24%, EDTA gel 24%+Cureta e EDTA gel 24%+ Ultrassom. Para análise morfológica foi realizada avaliação em Microscopia eletrônica de varredura, gerando micrografias obtidas por elétrons retroespalhados e elétrons secundários. A constituição química das amostras foi avaliada pela técnica de Energia dispersiva de raios X. Os resultados obtidos mostraram que, o grupo onde utilizou-se a associação EDTA+Ultrassom demonstrou ser o método de descontaminação mais eficaz, porém entre o grupo EDTA+Ultrassom e EDTA+Cureta não houve diferenças estatisticamente significantes. Morfológicamente, o grupo EDTA+Ultrassom apresentou maiores alterações na superfície. Quimicamente, não houve diferenças significantes dos elementos entre os grupos, porém notou-se a deposição de ferro e cloro no grupo utilizado cureta e maior presença de carbono em amostras com pior descontaminação. Esse estudo mostrou que o uso de EDTA+Ultrassom pode ser considerado um descontaminante eficaz, porém gera alterações nas superfícies dos implantes.

Palavras-chave: peri-implantite; osseointegração; descontaminação.

ABSTRACT

Peri-implantitis is one of the main causes of complications in osseointegrated implants, characterized by inflammation around the implant leading to marginal bone loss and, when left untreated, can cause implant failure. It can be influenced by different factors such as smoking and diabetes associated with an oral biofilm. Even though there are several forms of treatment, it is still much discussed among authors what would be the best approach to the disease. Thus, this study aimed to evaluate the decontamination of titanium surfaces using a chemical method and physical methods and also to analyze possible changes caused to surfaces after treatments. An in vitro study was carried out with 25 titanium disks, submitted to the culture of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and later divided according to the decontamination method, being decontaminated with phosphate buffer solution, 24% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) gel, and 24% EDTA gel+Curette and EDTA gel 24%+ Ultrasound. For morphological analysis, an evaluation was carried out in Scanning Electron Microscopy, generating micrographs obtained by backscattered electrons and secondary electrons. The chemical constitution of the samples was evaluated using the energy dispersive X-ray technique. The results obtained showed that the group where the EDTA+Ultrasound association was used proved to be the most effective decontamination method, however between the EDTA+Ultrasound and EDTA+Curet groups there were no statistically significant differences. Morphologically, the EDTA+Ultrasound group showed greater alterations on the surface. Chemically, there were no significant differences in the elements between the groups, however iron and chlorine deposition was noted in the curette group and a greater presence of carbon in samples with worse decontamination. This study showed that the use of EDTA+Ultrasound can be considered an effective decontaminant, however, it generates changes in the surfaces of the implants.

Keywords: peri-implantitis; osseointegration; decontamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Aspecto macroscópico do disco de titânio com nanotopografia e tamanho de 10 mm x 2 mm.	17
Figura 2 -Colônias bacterianas em meio de cultura líquido BHI Broth depositados em tubos de ensaio.	18
Figura 3 -Tampa da placa de 24 poços contendo os discos fixados com cola instantânea, separados por método de descontaminação, sendo seis discos por grupo.	19
Figura 4 -Placa de 24 poços contendo os corpos de prova mergulhados em 1,9 ml por poço de suspensão bacteriana.	19
Figura 5 -Processo de descontaminação utilizando cureta e aparelho de ultrassom, respectivamente.	21
Figura 6 -Placa de 96 poços contendo as diluições seriadas nas concentrações 10^{-1} e 10^{-2}	22
Figura 7 -Placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% onde foram semeados 20 µl de cada diluição, divididas ao meio por concentração de 10^{-1} e 10^{-2}	22
Figura 8 -Aspecto macroscópico de placa com Ágar BHI contendo Unidades Formadoras de Colônia (UFC).	23
Figura 9 -Valores da média e desvio-padrão para UFCs (Unidades formadoras de colônias) ($\times 10^{-2}$) encontrados nas superfícies dos discos após a descontaminação. Teste de Kruskal-Wallis, Dunn ($P < 0,05$).	25
Figura 10 -Microscopia eletrônica de varredura; Magnificação 1kx. (A) Controle; (B) EDTA; (C) EDTA+Cureta; (D) EDTA+Ultrassom; (E) Superfície controle.	27
Figura 11 -Espectros de EDS de um ponto das amostras. (A) Controle; (B) EDTA; (C) EDTA+Cureta; (D) EDTA+Ultrassom; (E) Superfície controle.	28
Figura 12 -Percentual da presença do elemento Ti de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.	29
Figura 13 -Percentual da presença do elemento O e F de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.	29
Figura 14 -Percentual da presença do elemento Fe e Cr de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.	30

Figura 15-Percentual da presença do elemento C de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn..... **30**

Figura 16-Imagens em três dimensões das superfícies utilizadas no estudo em 1kx. (A)Controle;(B)EDTA;(C)EDTA+Cureta;(D)EDTA+Ultrassom;(E)Superfície controle..... **32**

Figura 17-Espectros demonstrando valores de profundidade gerados pelos desgastes dos materiais utilizados. (A)Controle; (B)EDTA; (C)EDTA+Cureta; (D)EDTA+Ultrassom; (E)Superfície controle..... **33**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 MATERIAS E MÉTODOS	16
3.1 Caracterização dos discos	16
3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio	17
3.2.1 Cultura <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (A.a)	17
3.2.2 Contaminação das amostras	18
3.3 Descontaminação das amostras	19
3.4 Análises físico-químicas	23
3.5 Análise estatística e comparações	24
4 RESULTADOS	24
4.1 Descontaminação das amostras	24
4.2 MEV	26
4.3 EDS	28
4.4 Rugosidade dos discos	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação oral torna-se cada vez mais uma premissa na sociedade. Os implantes dentários osseointegrados são uma opção de tratamento muito difundida, eficaz e segura para a substituição dos espaços desdentados.^{1,2} E para garantir o sucesso do tratamento é fundamental que aconteça a osseointegração, que segundo Branemark et al.³ e Albrektsson and Sennerby⁴ define-se como o processo de conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a uma carga oclusal.

Contudo, apesar das elevadas taxas de sucesso e sobrevivência dos implantes dentários podem surgir complicações. Dentre os vários fatores que concorrem para o insucesso dos implantes osseointegrados podemos destacar a condição sistêmica do paciente, diminuição da capacidade de cicatrização, a qualidade óssea, o tabagismo, a experiência e habilidade do profissional, o uso de técnicas cirúrgicas inadequadas, excessivo trauma cirúrgico trauma mecânico durante a cicatrização, planejamento inadequado e atividades parafuncionais lesivas^{5,6,7}, entretanto, as principais causas de perda de implantes dentários parecem ser as tardias, que ocorrem após a reabilitação protética, como resultado de infecção bacteriana peri-implantar e de sobrecarga oclusal.^{8,9}

As principais falhas são as de condições inflamatórias, a mucosite peri-implantar e a peri-implantite.¹⁰ A peri-implantite é uma condição patológica associada à placa que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação na mucosa peri-implantar e subsequente perda progressiva do osso de suporte¹¹, e do ponto de vista clínico, apresenta sangramento e/ou supuração após delicada sondagem, aumento da profundidade de sondagem em relação a exames prévios, presença de perda óssea, além daquelas observadas após a fase de remodelação óssea.^{12,13} Conforme descrito por Tomasi e Derks¹⁴, a perda tardia do implante ocorre em 4% dos implantes e em 8% dos pacientes. Conforme documentado em análises transversais recentes, a peri-implantite constitui a complicação tardia mais frequente, afetando 15%-57% dos pacientes e 8%-28% dos implantes.¹⁵

O prognóstico da terapia de peri-implantite, no entanto, está longe de ser satisfatório. A principal característica da peri-implantite é a perda progressiva de osso peri-implantar marginal como consequência de inflamação crônica dos tecidos peri-implantares. Embora co-fatores específicos, como diabetes mellitus, tabagismo e higiene oral insuficiente tenham acelerado o

progresso da destruição óssea, o biofilme oral é essencial para que se inicie a inflamação dos tecidos peri-implantares.¹⁶

Os micro-organismos, no biofilme, apresentam fenótipo relativamente alterado em relação a taxa de crescimento, transcrição gênica e resistência bacteriana.¹⁷ Dezenove espécies bacterianas foram encontradas em contagens mais altas na peri-implantite, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *P. gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus anaerobius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *Treponema socranskii*¹⁸. Em uma revisão de literatura, realizada em 2020, verificou-se que a espécie *A. actinomycetemcomitans* é prevalente na peri-implantite em comparação com implantes saudáveis.¹⁶

Esta colonização bacteriana pode ser estruturada como um biofilme^{19,20} com um padrão de colonização inicialmente lento em comparação com a dentição natural.^{21,22} A formação de biofilmes na superfície do implante parece ser influenciada por suas propriedades, incluindo composição química, rugosidade da superfície e energia livre de superfície.²³ O tipo de superfície do implante tem um papel fundamental no prognóstico do tratamento e influencia diretamente nas propriedades de formação óssea e estabilidade. As propriedades da superfície do implante, como topografia, química e biocompatibilidade, têm sido extensivamente investigadas na osseointegração inicial e na prevenção de falhas nos implantes. Embora apenas alguns estudos forneçam dados sobre a suscetibilidade ao desenvolvimento de peri-implantite devido à topografia da superfície do implante^{24,25,26,27,28}, implantes com superfícies alteradas podem mostrar maior suscetibilidade à reinfecção por doença peri-implantar.²⁹ Portanto, parece plausível que os protocolos para descontaminação de superfícies podem ter efeitos diferentes com base na macro e micro topografia da superfície.³⁰

Tendo como objetivo prioritariamente a redução da carga bacteriana das bolsas peri-implantares e da superfície dos implantes, diversas alternativas para o tratamento da peri-implantite são propostas, utilizando, ou não, em conjunto técnicas de regeneração óssea e objetivando a reosseointegração. Há um grande interesse no uso de antimicrobianos locais, uma vez que o biofilme é citado como influência no início e na progressão da doença, mas em diversos casos o uso de métodos físicos de forma adjunta é necessário para melhores resultados. O desbridamento mecânico das superfícies dos implantes pode ser precedido pela aplicação de

agentes antibacterianos e químicos, como gluconato de clorexidina, peróxido de hidrogênio, solução salina estéril, ácido fosfórico, gel antibiótico ou uso de um laser (Er:YAG), e também ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 24%.³¹

O EDTA é utilizado como solução irrigadora devido aos seus principais atributos, como: ação quelante³², capacidade de aumentar a permeabilidade da dentina³³, capacidade de remover a smear layer³⁴, capacidade de desinfetar canais radiculares³⁵ e papel na remoção de medicação intracanal³⁶, tornando-o a solução de escolha para pesquisas e tratamentos. O EDTA também pode ser encontrado em forma de gel, que é útil para a remoção de detritos³⁷, raspagem e alisamento radicular em tratamentos periodontais e peri-implantares^{38,39}, e como lubrificante em casos de raízes atrésicas e/ou obstruídas em tratamentos de canal.⁴⁰ Por ser um material fluído, consegue atingir áreas que mecanicamente seriam impossíveis.⁴¹ O EDTA combinado com métodos mecânicos de limpeza pode ser promissor para a descontaminação de superfícies de implante. Em um estudo de Kotsakis et al.(2016), mostrou-se que a solução de 24% EDTA/1,5% NaOCl descontaminou e não alterou a biocompatibilidade e manteve a preservação da superfície de titânio utilizada, diferentemente de outros métodos de descontaminação.⁴²

Dentro do biofilme, as bactérias mostram uma resistência extrema a desinfetantes tópicos e antibióticos sistêmicos.⁴³ Dessa forma, os implantes podem ser mecanicamente higienizados utilizando instrumentos rotatórios ou manuais e pastas de polimento. Numerosos métodos foram documentados para desbridamento não cirúrgico em implantes e dentes, incluindo curetas, dispositivos ultrassônicos, terapia fotodinâmica antimicrobiana e dispositivos abrasivos a ar com glicina ou pó de eritritol.^{44,45,46,47,48,49} No entanto, devido ao formato do implante e características específicas do defeito, o acesso a todas as áreas afetadas é limitado. Para reduzir possíveis danos à superfície do implante, em um estudo de Heitz-Mayfield et al. (2016), foram utilizados para remoção do biofilme curetas de titânio ou fibra de carbono, dispositivos de ultrassom com pontas de plástico ou taça de borracha e pasta de polimento. Nesse estudo, a maioria dos implantes (94%) tinham uma superfície áspera ou moderadamente rugosa e os resultados foram satisfatórios.⁵⁰

Já em outra revisão realizada por Mellado-Valero et al. (2013) concluiu-se que não foi possível estabelecer um único protocolo de descontaminação do implante para o tratamento da peri-implantite devido à grande heterogeneidade dos estudos, diferentes métodos de

descontaminação e variabilidade das superfícies do implante.⁵¹ Com aumento do número de procedimentos implantares e tendo em consideração que a etiopatogenia da peri-implantite não está totalmente esclarecida, questiona-se ainda qual será o tratamento eficaz para a doença peri-implantar ⁵², tendo em vista as características físicas e químicas do implante quanto a regeneração dos tecidos que foram perdidos em consequência da doença. Enquanto a eliminação dos patógenos bacterianos e seus remanescentes é vital para resultados clínicos estáveis do implante, a biocompatibilidade da superfície do implante, a gravidade inicial da doença e a morfologia do defeito também podem influenciar o resultado de certas terapias.

Para a elaboração deste estudo realizou-se a uma pesquisa detalhada de literatura e mostrou-se que a terapia mais eficaz para a peri-implantite ainda não foi identificada de forma conclusiva, ainda não existe entre os tratamentos para a peri-implantite um padrão ouro. Por este motivo, justifica-se analisar separadamente somente o método químico, com uso de EDTA 24% e seus resultados e também o método químico em associação com métodos mecânicos, sendo eles curetas e aparelho de ultrassom, comparando esses resultados e avaliando um tratamento mais eficaz para a doença, que leve em consideração o potencial de limpeza e possíveis alterações na superfície após a instrumentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a descontaminação de superfícies de titânio contaminadas com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, utilizando método químico (EDTA gel 24%) de forma isolada e associado a métodos físicos (Cureta e Aparelho ultrassônico).

2.2 Objetivos específicos

Verificar na superfície de titânio, após o uso dos agentes descontaminantes:

1. Valores quantitativos de Unidades formadoras de colônias encontrados nas superfícies após as descontaminações;
2. Diferenças químicas elementares entre os discos que receberam somente tratamento químico e tratamento químico e físico, por meio de Energia dispersiva de raios x (EDS);
3. Alterações morfológicas, por meio do Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
4. Resíduos dos agentes de descontaminação, por meio de Energia dispersiva de raios x.

3 MATERIAS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Estudos Básicos, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

3.1 Caracterização dos discos

Foram utilizados 25 discos de titânio fornecidos pela empresa Neodent® (Curitiba, Paraná, Brasil), superfície com nanotopografia (Ataque ácido+Jateamento) e tamanho de 10 mm x 2 mm, o formato dos discos utilizados estão representados na Figura 1. O número de amostras foi definido após pesquisa na literatura, onde foram realizados estudos *in vitro* em implantes contaminados com número de amostras semelhantes.^{53,54}



Figura 1-Aspecto macroscópico do disco de titânio com nanotopografia e tamanho de 10 mm x 2 mm.

3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio

3.2.1 Cultura *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a)

Nesta fase realizou-se o cultivo do agente microbiano utilizado na pesquisa, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a), patógeno presente na Peri-implantite. A cepa de A.a ATCC 29523 foi cedida e encontrava-se no Laboratório de Estudos Básicos em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

A espécie bacteriana A.a foi cultivada durante sete dias em placa de Ágar Sangue TSE 5% em aerobiose a 37°C.⁵⁵ Em seguida foi transferida para tubos de falcon contendo meio de cultura líquido BHI Broth (Brain Heart Infusion Agar, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA) e mantido por 24 horas.



Figura 2-Colônias bacterianas em meio de cultura líquido BHI Broth depositados em tubos de ensaio.

3.2.2 Contaminação das amostras

A partir do meio já preparado contendo colônias bacterianas, foi verificada a concentração celular por densidade óptica no Espectrofotômetro (V5100, Metash, Shanghai Instruments) a 600 nm e a concentração ajustada para 10^8 (0,09 e 0,11) células por ml e depois ajustada pelo tamanho 29,4 ul/ml de meio para ter uma concentração de 10^7 células para serem adicionadas ao inóculo que foi utilizado para a formação dos biofilmes. Como blank (controle negativo) foi utilizado o meio de cultura caldo BHI Broth livre de colônias bacterianas.

Com a concentração devidamente determinada, os discos foram fixados em anteparos plásticos previamente esterilizados e fixados na tampa de uma placa de 24 poços (NUNC-TM) (Thermo Scientific. Roskilde, Denmark) com auxílio de pinça anatômica e de adesivo instantâneo, sendo separados de acordo com seu tratamento de descontaminação. Em seguida colocados em contato com a suspensão bacteriana no interior de cada poço, com volume total de 1,9 ml por poço.

As placas de 24 poços contendo a suspensão bacteriana e os corpos de prova permaneceram incubadas em caixa de microaerofilia durante 7 dias para que fossem realizadas as descontaminações.

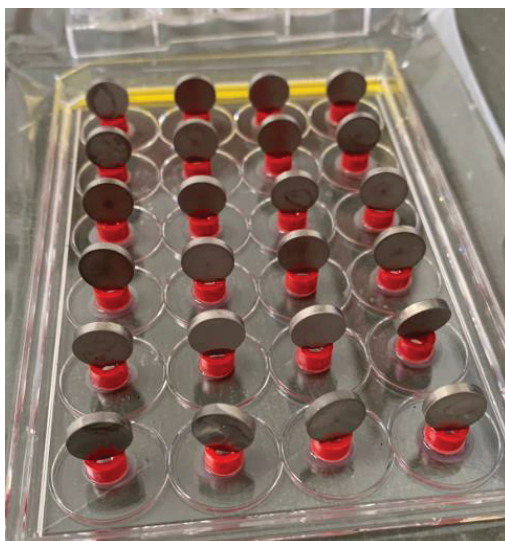


Figura 3-Tampa da placa de 24 poços contendo os discos fixados com cola instantânea, separados por método de descontaminação, sendo seis discos por grupo.



Figura 4-Placa de 24 poços contendo os corpos de prova mergulhados em 1,9 ml por poço de suspensão bacteriana.

3.3 Descontaminação das amostras

Os discos, após a contaminação, foram divididos de acordo com seu método de descontaminação:

DISCOS Ti (n=24)	GRUPO A - SOLUÇÃO-TAMPÃO PBS 1x (N=6)
	GRUPO B - EDTA GEL 24% (N=6)
	GRUPO C - EDTA GEL 24% + CURETA (N=6)
	GRUPO D - EDTA GEL 24% + ULTRASSOM (N=6)

Antes de iniciar-se e ao fim do processo de descontaminação, todos os discos foram mergulhados em solução-tampão PBS 1x, sendo que, 6 amostras passaram somente por esta etapa, atuando como um grupo controle.

Primeiramente, foi realizada a descontaminação química com solução em gel de EDTA 24% (N=6).

A solução em gel de EDTA 24% (Biodinâmica[®]) foi depositada em 18 poços de uma nova placa de 24 poços com uma quantidade de aproximadamente 2 ml em cada poço. Os discos, previamente identificados, foram então mergulhados na solução durante 2 minutos.⁵⁶ Após a aplicação do antimicrobiano local EDTA gel 24%, as curetas e o dispositivo de ultrassom foram aplicados em um ângulo de aproximadamente 30° para simular a abordagem intraoral.⁵⁷ Em relação a quantidade e o tempo de instrumentação, após uma ampla pesquisa na literatura e usando como base outros estudos realizados⁵⁷, as curetas foram manuseadas nos discos 20 vezes, em cada face, em um tempo de aproximadamente 3 minutos. Foram utilizadas 6 curetas de Gracey de aço inoxidável (Hu-Friedy, Chicago, Illinois, USA).

O aparelho de ultrassom foi operado em potência alta com o tempo de no máximo 120 segundos, manuseados 20 vezes em cada face com irrigação de água destilada de forma contínua.⁵⁸ O aparelho e a ponta tipo Periosub utilizados foram do modelo Profi Neo - Dabi Atlante (ALLIAGE S/A INDUSTRIAS MEDICO ODONTOLOGICA, Ribeirão Preto), com potência de 36W.

Todas as etapas foram feitas pelo mesmo operador calibrado e com treinamento prévio.

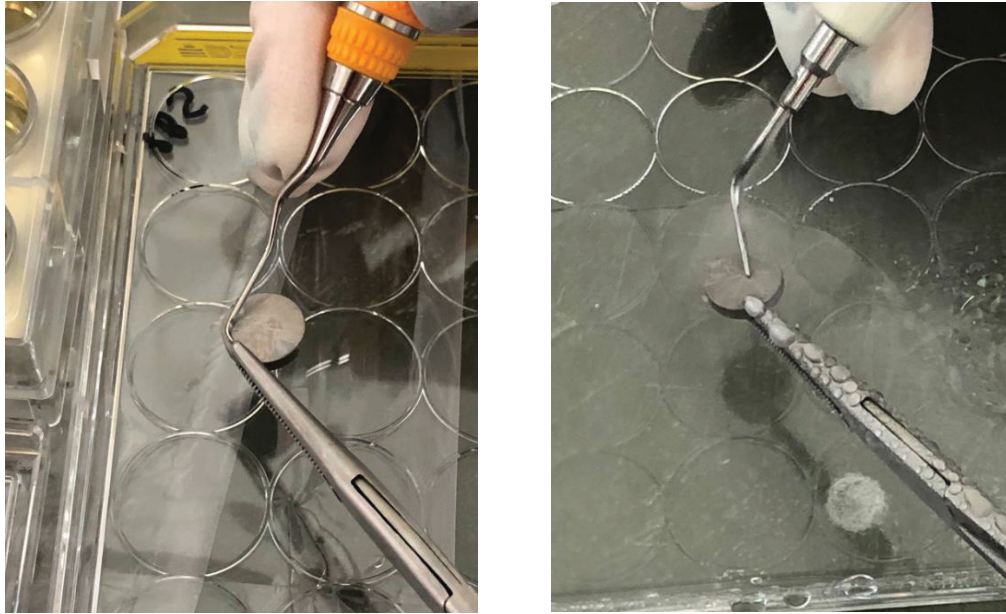


Figura 5-Processo de descontaminação utilizando cureta e aparelho de ultrassom, respectivamente.

Em continuidade ao segundo mergulho na solução PBS 1x, 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)]. Esta placa de 24 poços contendo os discos passaram por um processo de sonicagem durante 20 segundos para coletar as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) resistentes a descontaminação da superfície dos corpos de prova.

Após a sonicagem, foi coletado 200 μ l de suspensão de cada poço contendo meio de cultura caldo BHI Broth + 5% Tween 20 e feitas duas diluições seriadas em placas de 96 poços, nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-2} .

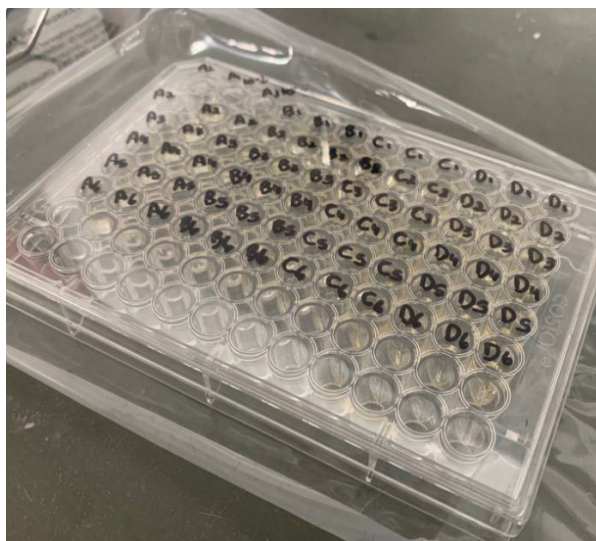


Figura 6- Placa de 96 poços contendo as diluições seriadas nas concentrações 10^{-1} e 10^{-2}

A partir das diluições, foram coletados 20 μ l de cada diluição e, então, semeados o conteúdo em placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% previamente identificadas.

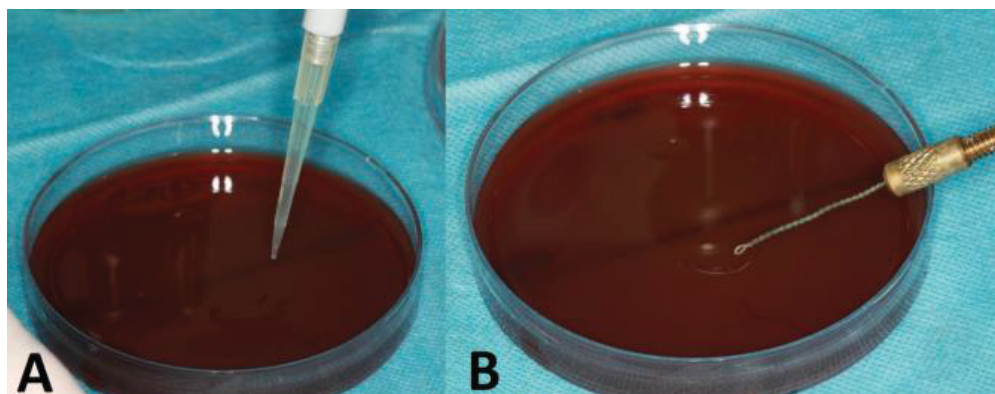


Figura 7-Placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% onde foram semeados 20 μ l de cada diluição, divididas ao meio por concentração de 10^{-1} e 10^{-2}

As placas de ágar foram mantidas em caixas de microaerofilia (com 5% de CO_2) a 37°C por 4 dias, antes da contagem de UFC. Através de análise visual das placas de ágar após o período de incubação, foi realizada uma análise quantitativa das UFC. Todas as análises foram realizadas por um mesmo examinador treinado e de forma duplicada, obtendo assim médias das Unidades encontradas em cada diluição.



Figura 8- Aspecto macroscópico de placa com Ágar BHI contendo Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

3.4 Análises físico-químicas

Para análise da morfologia foi usado um microscópio Tescan Vega3 LMU (Tescan, Brno, Czech Republic). A constituição elementar das amostras foi avaliada por energia dispersiva de raios X (EDX, Oxford Instruments, Abingdon). Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As amostras foram submetidas ao processo de descontaminação e na sequência foram levadas para análise de MEV. Não foi realizado nenhum tipo de preparação de amostra para realização das imagens de microscopia e as obtenções de espectros de EDS.

Foram selecionados 2 discos de cada grupo após os métodos de descontaminação, para ser feita a comparação das superfícies. Como parâmetro de comparação, foram feitas análises em um disco virgem estéril, sem nenhum tipo de contaminação e tratamento.

Para serem analisados valores em relação a profundidade de desgaste gerada pelos materiais, foram geradas 3 imagens com diferentes angulações (-5° , 0° e 5°) dos discos e então formada uma imagem com formato 3D no método Alicona. A partir dessa imagem gerada, foram traçadas linhas para avaliar numericamente e morfologicamente possíveis alterações nas superfícies.

Para serem obtidas as imagens e os pontos de escolha para as análises, inicialmente realizou-se uma varredura por toda a superfície do disco e selecionadas as áreas com maiores alterações, regiões onde pode se notar visualmente um maior desgaste na superfície.

A magnificação das imagens realizada nas amostras foi de 1kx. A energia aplicada para o EDS foi de 15.0 kV.

3.5 Análise estatística e comparações

Para realizar a análise estatística, foi utilizado como auxílio o Programa GraphPad Prism (versão Prism 8 for Mac OS X, San Diego), adotando-se em todos os testes o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$) e também teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.⁵⁹

4 RESULTADOS

4.1 Descontaminação das amostras

Os resultados obtidos dos parâmetros de interesse (unidades formadoras de colônias resistentes de acordo com a metodologia de descontaminação) foram demonstrados em um gráfico (Figura 9) no qual as diferenças estatisticamente significantes foram assinaladas e descritos (Tabela 1) através dos valores de média \pm desvio-padrão.

TABELA 1 – Valores de média e desvio-padrão para UFCs (Unidades formadoras de colônias)($\times 10^{-2}$) encontrados nas superfícies dos discos após a descontaminação. Letras diferentes apontam diferenças estatísticas. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn ($P < 0,05$).

GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
PBS	EDTA	EDTA+CURETA	EDTA+ULTRASSOM
96,0 \pm 60,1 ^B	54,3 \pm 45,8 ^B	21,8 \pm 16,7 ^{AB}	5,1 \pm 6,7 ^A

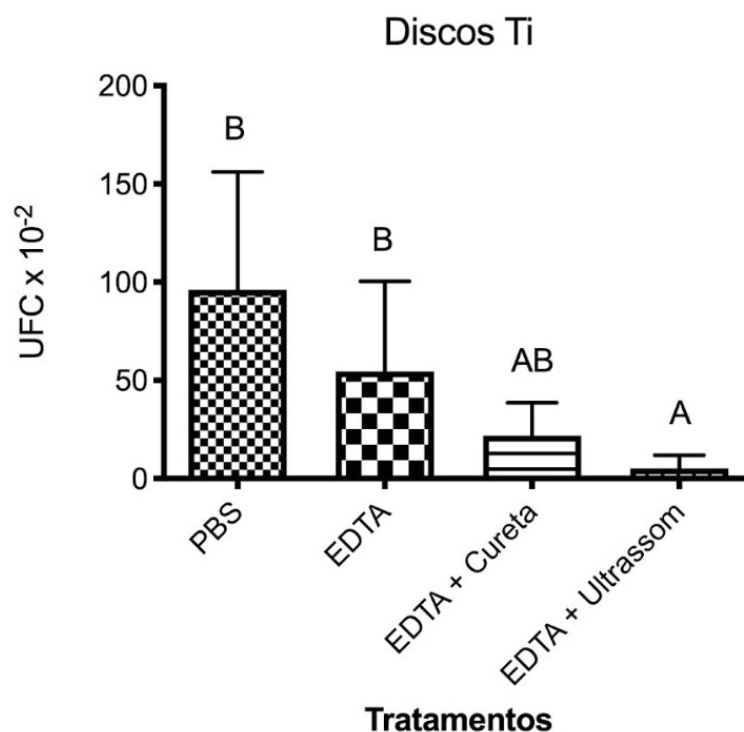


Figura 9-Valores da média e desvio-padrão para UFCs (Unidades formadoras de colônias) ($\times 10^{-2}$) encontrados nas superfícies dos discos após a descontaminação. Teste de Kruskal-Wallis, Dunn ($P < 0,05$)

Analisando-se individualmente cada grupo em relação a eficiência da descontaminação, pode-se notar que o grupo onde os discos foram descontaminados somente de forma química (EDTA gel 24%) não apresentou diferenças em relação ao grupo controle, onde se utilizou somente PBS 1x, sendo considerado um método ineficaz para o tratamento.

O grupo de associação método químico e mecânico, onde foi utilizada a cureta posteriormente ao EDTA, apresentou resultados mais satisfatórios analisando-se a quantidade de colônias bacterianas remanescentes em comparação ao grupo PBS e somente EDTA, porém estatisticamente essas diferenças não foram significantes. Em relação ao grupo onde também utilizou-se associação de métodos, EDTA+Ultrassom, não houve diferenças estatisticamente significantes quanto a eficiência descontaminatória ($p > 0,05$).

Foi observado que, entre os métodos de descontaminação, o mais eficaz em relação aos outros grupos foi o grupo onde utilizou-se EDTA Gel 24% + Aparelho de ultrassom. Os discos descontaminados com esse grupo tiveram um número menor de colônias bacterianas

remanescentes, como mostrado no gráfico (Figura 9). Porém, estatisticamente, houve diferenças somente em relação ao grupo PBS ($p= 0,0011$) e ao grupo EDTA ($p= 0,0422$).

Os valores estatísticos do desvio-padrão foram altos pois pode-se notar grandes diferenças entre o remanescente bacteriano nos discos dentro do mesmo grupo de descontaminação.

4.2 MEV

Pode-se analisar segundo as imagens (Figura 10) que, morfologicamente, a superfície com mais alterações foi a que se utilizou o método EDTA+Ultrassom, porém a superfície descontaminada com EDTA+Cureta também apresentou alterações, porém menos expressivas.

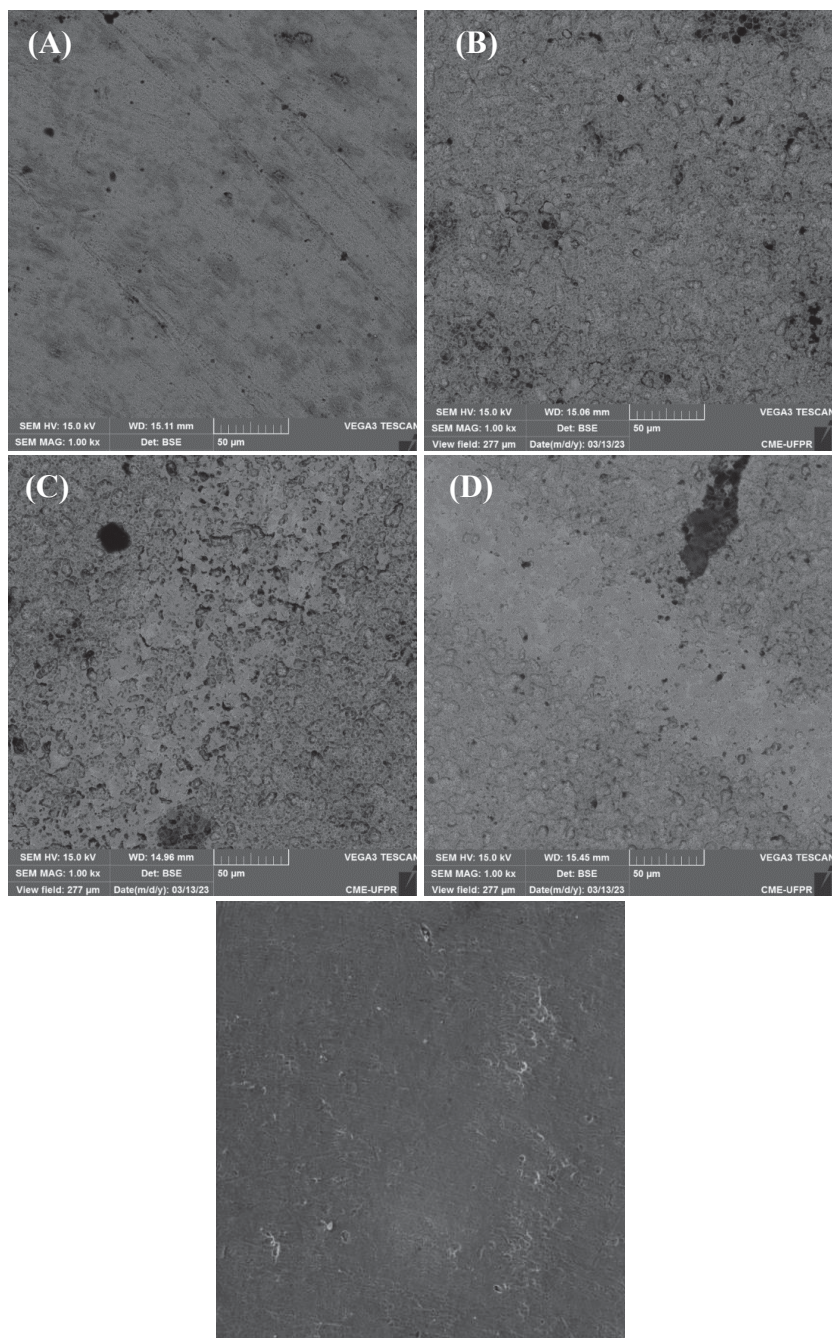


Figura 10-Microscopia eletrônica de varredura; Magnificação 1kx.
 (A)Controle;(B)EDTA;(C)EDTA+Cureta;(D)EDTA+Ultrasound;(E)Superfície controle.

4.3 EDS

A química de superfície foi estudada através de espectroscopia de dispersão de energia. A figura 11 apresenta o espectro de um ponto de cada amostra. Os valores de média e desvio-padrão de cada grupo são demonstrados nos gráficos.

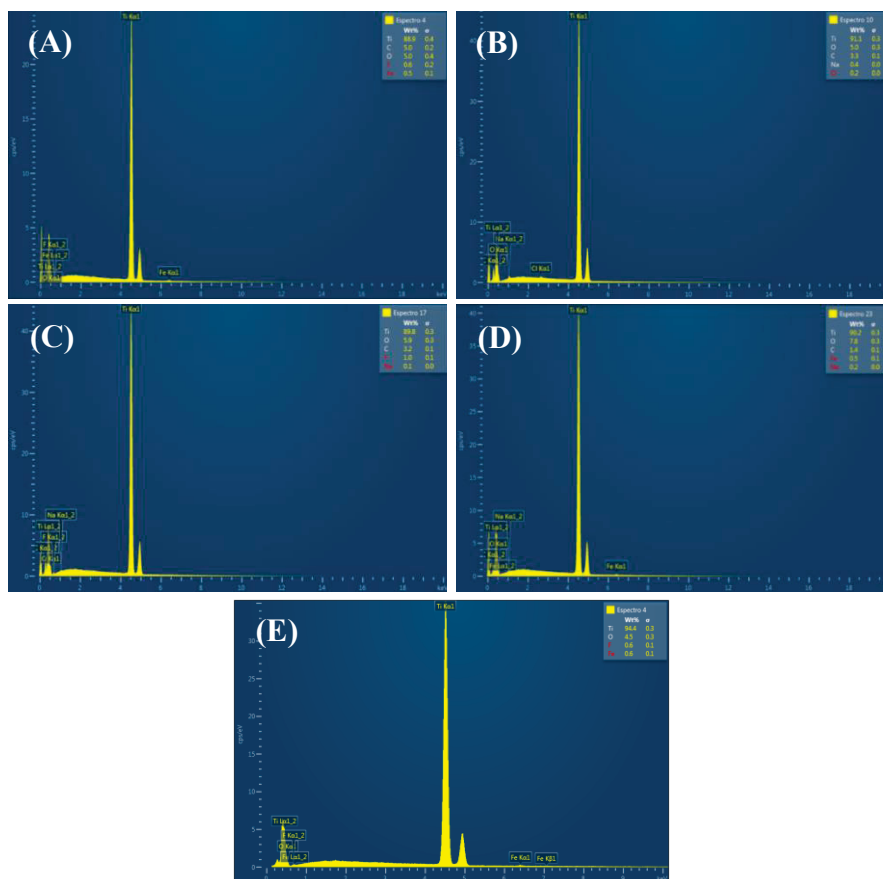


Figura 11- Espectros de EDS de um ponto das amostras. (A)Controle;(B)EDTA;(C)EDTA+Cureta;(D)EDTA+Ultrassom;(E)Superfície controle.

Com relação aos elementos químicos observados foi detectada a presença de Titânio, Oxigênio, Carbono, Flúor, Ferro, Sódio, Fósforo, Cloro, Sílica e Cálcio. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as amostras.

Para o elemento Titânio foi observado que ele foi predominante em todas as amostras. Os resultados mostraram que a porcentagem de presença de Ti nos grupos foi semelhante.

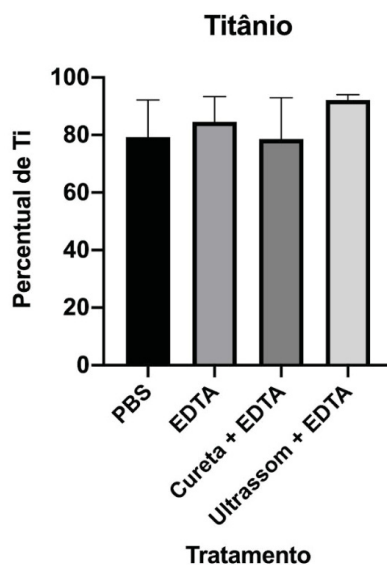


Figura 12- Percentual da presença do elemento Ti de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Para o elemento Flúor e Oxigênio não foram notadas diferenças entre as amostras.

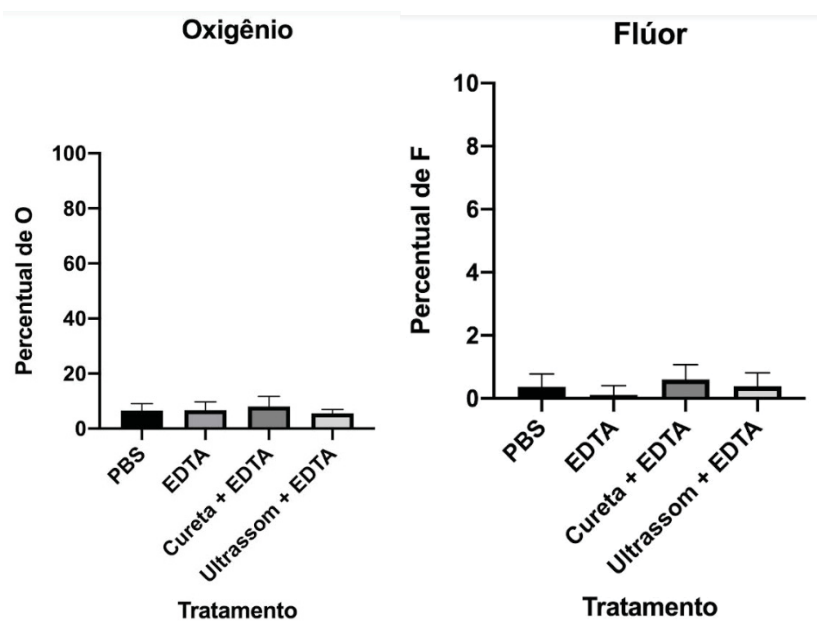


Figura 13-Percentual da presença do elemento O e F de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Para o elemento Ferro e Cromo, notou-se uma maior quantidade no grupo onde utilizou-se EDTA 24%+Cureta.

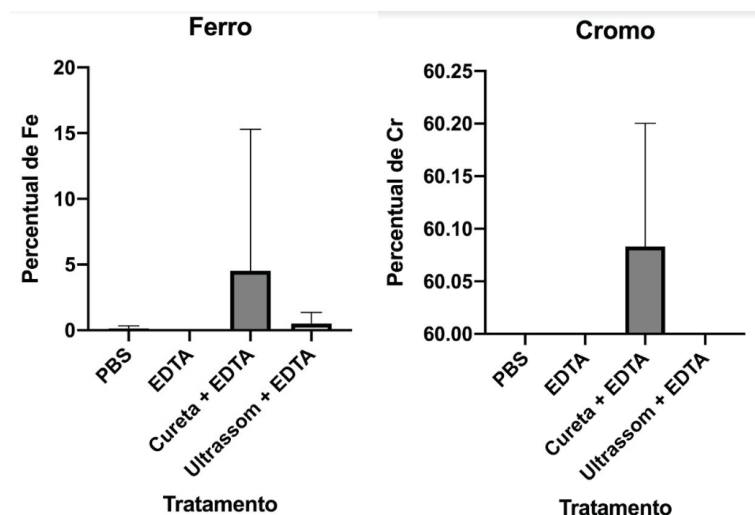


Figura 14-Percentual da presença do elemento Fe e Cr de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Para o elemento Carbono foi observado uma maior quantidade relacionada ao método de descontaminação menos eficaz, ou seja, quanto maior o resíduo bacteriano, maior a quantidade de Carbono presente.

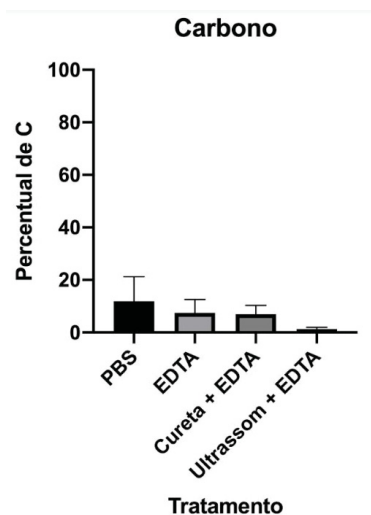


Figura 15-Percentual da presença do elemento C de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Os elementos Sódio, Fósforo, Sílica e Cálcio, apesar de presentes, não tiveram variações consideráveis entre os grupos.

4.4 Alterações nas profundidades dos discos

Analisando individualmente as superfícies dos discos em relação a profundidade dos desgastes gerados pelos métodos de descontaminação, pode-se notar que mesmo tendo um maior grau de alteração, com o uso de ultrassom, por exemplo, esses desgastes não são significativos. A figura 16 mostra morfologicamente as alterações das superfícies.

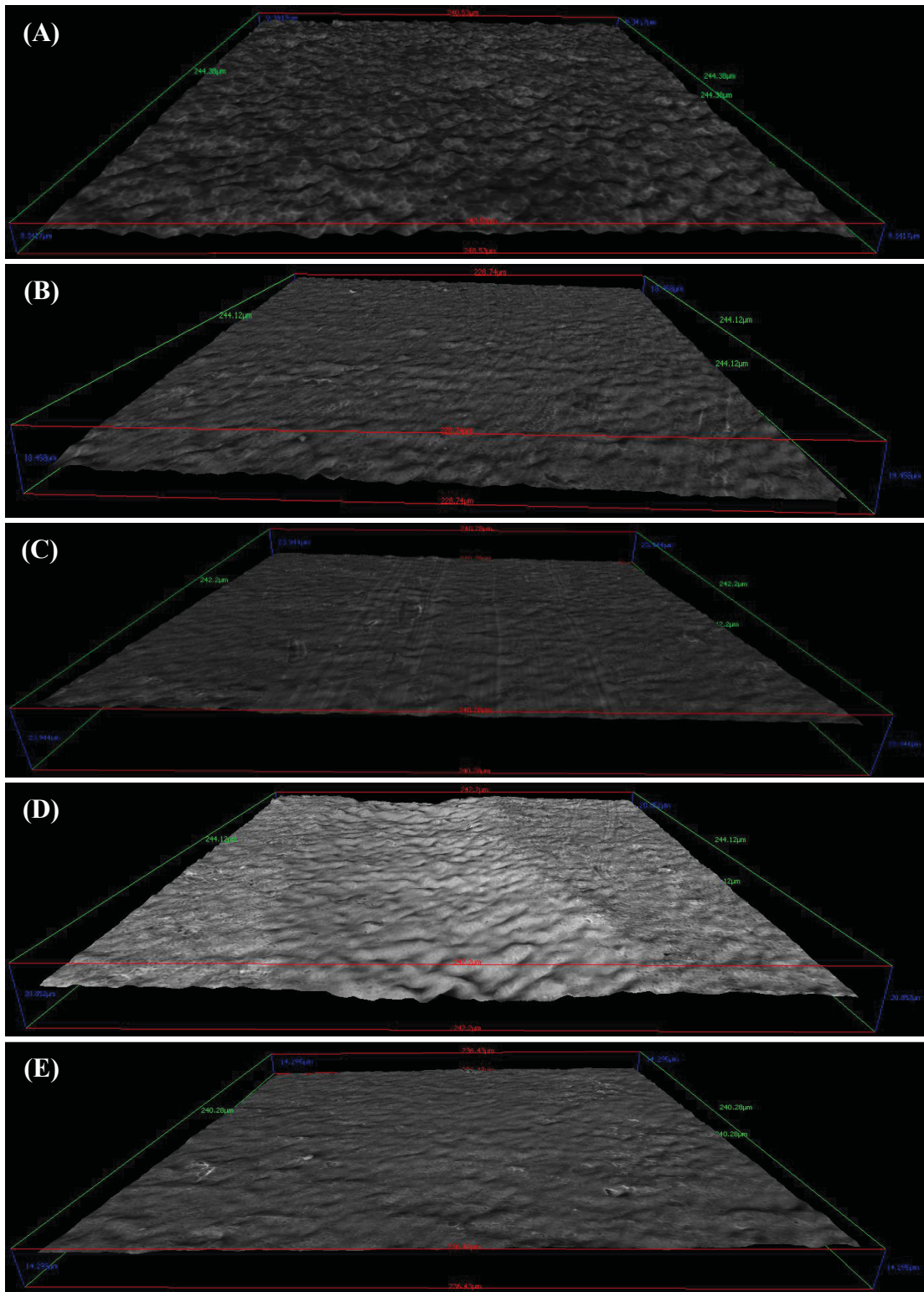


Figura 16-Imagens em três dimensões das superfícies utilizadas no estudo em 1kx.
 (A)Controle;(B)EDTA;(C)EDTA+Cureta;(D)EDTA+Ultrassom;(E)Superfície controle.

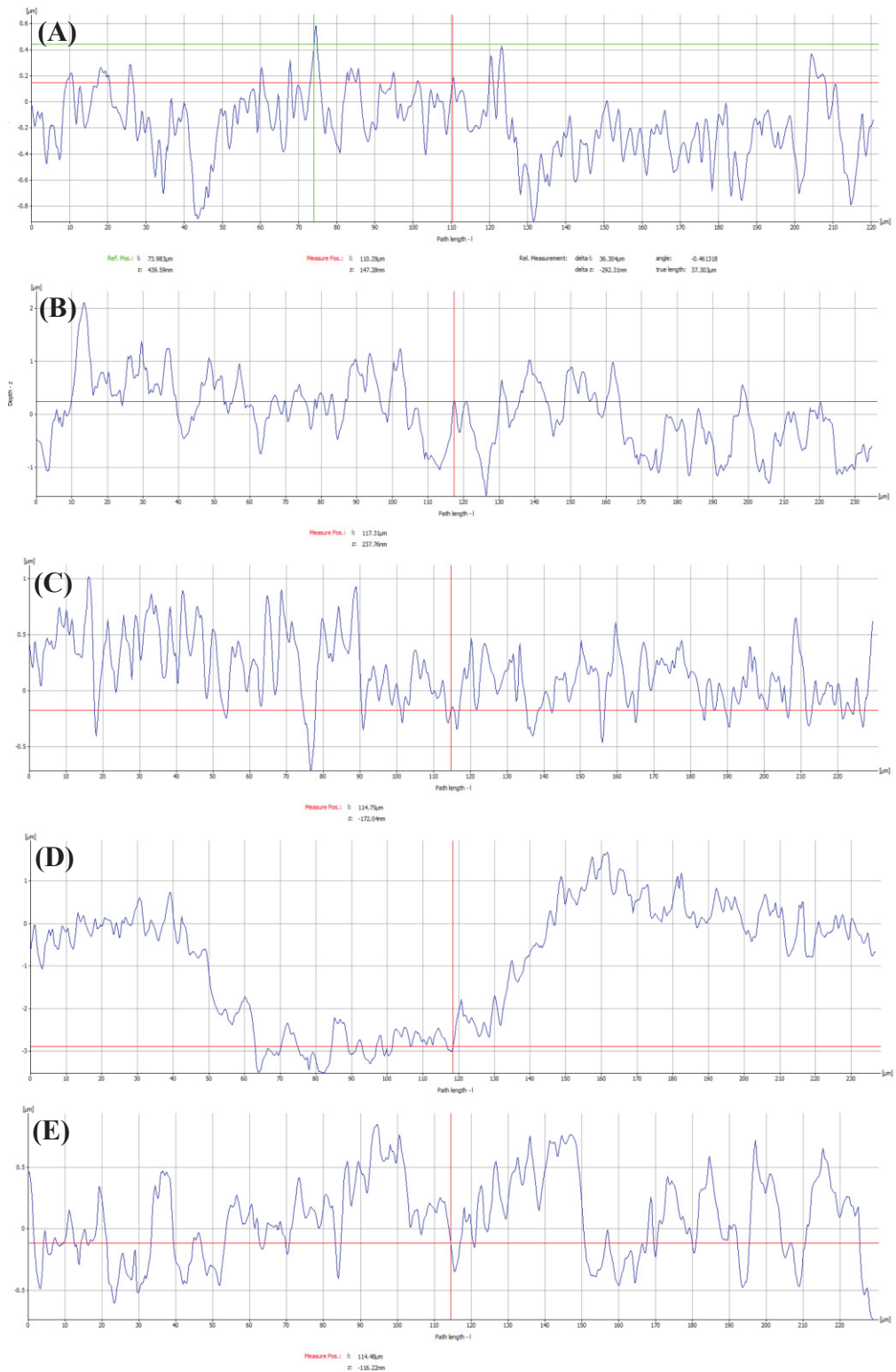


Figura 17-Espectros demonstrando valores de profundidade gerados pelos desgastes dos materiais utilizados. (A) Controle; (B) EDTA; (C) EDTA + Cureta; (D) EDTA + Ultrassom; (E) Superfície controle.

Analisando numericamente as profundidades dos desgastes, segundo as variações apresentadas na figura 17, pode-se notar que a superfície onde foi utilizado o EDTA+Ultrassom apresentou um desgaste com valor de aproximadamente -3 um, sendo o maior valor de profundidade em relação as outras superfícies.

O grupo controle e o grupo onde foi utilizado somente o EDTA, comparando-se com o disco virgem não apresentaram alterações de profundidade na superfície.

A utilização do EDTA+Cureta gerou riscos na superfície, porém numericamente, demonstrou um valor de aproximadamente -0,5 um de desgaste.

5 DISCUSSÃO

A Peri-implantite representa uma das principais causas de perda de implantes osseointegrados, sendo um dos maiores desafios para o cirurgião-dentista. Apesar de estudos abordarem diversas técnicas e opções de tratamento para essa complicação, ainda não existe o padrão ouro quando abordamos terapias para peri-implantite.⁶⁰ O objetivo do uso de agentes químicos é a total descontaminação da superfície de Ti, no entanto essa situação não é observada na literatura. Pois além de eliminar a presença bacteriana e suas toxinas, o agente químico ideal deve ser passível de sua completa remoção, sendo necessário em alguns casos a utilização de métodos mecânicos, devolvendo à superfície suas características de biocompatibilidade fundamentais para a reosseointegração.⁶¹

Mesmo encontrando-se diversas dificuldades e limitações para se realizar um tratamento eficaz, como o acesso a região contaminada, o tipo e tamanho do defeito ósseo encontrado e a morfologia do implante, é fundamental que ocorra uma descontaminação adequada dos implantes para que se tenha um bom prognóstico da doença. O tratamento ideal consiste em remover o máximo de agentes infecciosos presentes, sem que altere as propriedades da superfície afetada, para que com isso se chegue ao processo de reosseointegração e regeneração tecidual e o implante permaneça em função durante toda a vida. Apesar da importância do assunto, os estudos ainda são limitados e inconclusivos sobre um método ideal.

O objetivo principal deste estudo foi comparar os efeitos da descontaminação de discos de titânio utilizando métodos químicos e mecânicos, sendo eles EDTA em gel 24%, curetas em aço inoxidável e ponta de ultrassom em aço inoxidável. Foi determinado que, baseado em

análises quantitativas de UFC, a combinação EDTA + Ultrassom foi a mais efetiva em relação a capacidade de descontaminação, tendo como aplicação o gel durante 2 minutos⁶² e o aparelho de ultrassom durante o tempo proposto.

O método mecânico associado ao método químico, neste estudo, utilizando-se discos de titânio, apresentou melhores resultados em comparação ao método químico isolado, porém diversos fatores precisam ser levados em consideração como estrutura do defeito, quanto à morfologia do implante, como a largura, profundidade e angulação do defeito, e a forma, profundidade e distância entre as roscas do implante.⁶³ O aparelho de ultrassom demonstrou ser eficiente em relação a descontaminação bacteriana, assim como trouxe outro estudo, realizado em 2018, onde foi demonstrado que a aplicação do raspador de metal ultrassônico resultou na redução da rugosidade da superfície com remoção eficiente de bactérias.⁶⁴ Precisa ser levada em consideração a presença de irrigação, do jato de água destilada liberado no funcionamento do aparelho ultrassônico, técnica clínica utilizada pela maioria dos profissionais, que pode atuar como um complemento da ação mecânica, contribuindo para os resultados positivos da descontaminação. Nesse estudo não foram feitas análises utilizando somente métodos mecânicos, tornando-se uma limitação para avaliar a eficácia do mesmo.

Do ponto de vista clínico, o uso de pontas de aço em superfícies de implantes tem sido desaconselhado, tanto como lisa, quanto rugosa as superfícies são alteradas após o seu uso, porém um estudo recente sobre superfícies de implantes instrumentadas com pontas de aço mostrou que não houve aumento na rugosidade de superfícies rugosas, nem crescimento bacteriano aumentado em superfícies alteradas.⁶⁵

Em relação as alterações causadas na superfície dos discos, foi avaliado que o ultrassom gera desgastes mais significativos comparado a outros métodos de descontaminação e isso é abordado na literatura, outros estudos in vitro mostram que a ponta ultrassônica de metal produz um maior grau de alteração no discos de titânio, resultando em uma superfície mais lisa em comparação com os outros grupos.⁶⁶

Estudos in vitro avaliaram os efeitos de diferentes instrumentos, incluindo curetas de titânio, curetas de aço inoxidável curetas de plástico, copos de borracha com pasta, ultrassom e polimento de ar com pó de limpeza nas superfícies de titânio. Foi demonstrado que enquanto o ultrassom com pontas universais e a cureta Gracey deixaram vestígios, a cureta de titânio e o ultrassom com pontas suaves não deixaram vestígios aparentes. Esses traços podem interferir

na cicatrização da ferida óssea.²³ pois a superfície apresenta uma camada de óxido fina, durável e auto-reparável que desempenha um papel importante na osseointegração do implante, mediando interações célula-superfície, como adsorção de proteínas, adesão e diferenciação celular e, eventualmente, formação óssea e remodelação.⁶⁷

Entretanto, um estudo piloto realizado na Universidade Federal do Paraná (em processo de submissão) avaliou, química e fisicamente, alterações nas superfícies de 15 discos de titânio que sofreram descontaminações mecânicas com o uso de cureta convencional de aço inoxidável, cureta de titânio, ultrassom e laser de diodo. Os resultados mostraram que os discos descontaminados com ultrassom foram os mais alterados, apresentando maiores deformações e modificações em relação a composição química. Porém, o mesmo estudo mostrou que, comparando-se os dois tipos de curetas utilizadas, não houveram diferenças tanto morfológicas quanto químicas que se justifique a utilização de uma em específico. Por este motivo, no presente estudo utilizou-se apenas cureta de aço inoxidável, pois a cureta de titânio traria resultados similares.

Entre os métodos avaliados neste estudo, o EDTA, isoladamente, teve o pior desempenho em relação a descontaminação. Essa falta de eficácia está de acordo com os achados de outros estudos^{68,69} contra-indicando o uso de EDTA como agente único de descontaminação para peri-implantite ou mucosite peri-implantar. Wohlfahrt et al. desbridaram 32 defeitos de peri-implantite com curetas de Ti, limpavam com EDTA 24% por 2 minutos e enxaguaram com solução salina e descobriram que o EDTA reduziu a profundidade de sondagem em 2,6 mm. Além disso, Kotsakis et al. trataram as superfícies dos implantes com CA 20%, CHX 0,12%, EDTA 24%, cloridrato de sódio 1,5% ou solução salina estéril (controle). Seus resultados demonstraram que as contagens bacterianas foram significativamente reduzidas após a descontaminação e uso dos agentes quimioterápicos. No entanto, o resíduo do agente EDTA causou alguns efeitos citotóxicos em comparação com o controle. Assim, o EDTA deve ser usado com cautela no tratamento da peri-implantite.⁷⁰

Neste estudo, um biofilme monoespécie de *A. actinomycetemcomitans* foi utilizado como desafio bacteriano para avaliar os tratamentos de descontaminação de superfícies de titânio. As bactérias foram cultivadas em discos de titânio por um período de 7 dias, tempo semelhante a formação do biofilme na cavidade oral.⁵⁵ Resultados de estudos in vitro com biofilmes monoespécies podem ser usados para entender biofilmes mais complexos em

interações *in vivo*⁷¹. Regiões de peri-implantite foram associados a níveis mais altos de *Actinomyces* do que regiões peri-implantares saudáveis.⁷²

Foram utilizados nesse estudo, discos com superfície em nanotopografia. Atualmente a nanomodificação está direcionada para a criação de uma superfície que facilite a fixação de células osteogênicas, ao invés de bactérias, que são repelidas. Estruturas semelhantes a espículas são um exemplo de superfície biomodificada.⁷³ Se as bactérias aderirem à superfície, esses picos penetram na célula e causam a ruptura de sua membrana celular, resultando em sua morte. Uma preocupação com esse conceito é que as células presas nessas espículas podem permitir que outras bactérias possam se aderir. Assim, vários métodos de aplicação de medicamentos antibacterianos foram defendidos, para manter uma camada livre de bactérias na superfície nanomodificada.⁷⁴

A reação das células e tecidos aos biomateriais depende das propriedades do material, topografia de superfície, composição elementar e seu comportamento em contato com corpos fluidos⁷⁵. Foi demonstrado que células osteoblásticas aderem mais facilmente a superfícies ásperas enquanto as células epiteliais e fibroblastos preferem superfícies lisas e finamente texturizadas.^{76,77}

Observou-se que a microestrutura da superfície pode influenciar o crescimento e a fixação epitelial de fibroblastos. Portanto, alterações na topografia da superfície podem ter uma influência seletiva na fixação de células epiteliais e fibroblastos, impactando na manutenção ou restabelecimento da vedação do tecido mole ao redor dos implantes depois do tratamento.^{78,79,80}

Do ponto de vista clínico, considerando as limitações do método *in vitro* e sabendo que os estudos revelaram que a terapia não cirúrgica isoladamente tem eficácia limitada no manejo da maioria dos casos de peri-implantite⁸¹, os presentes resultados ajudam a explicar possíveis causas de falhas e a dificuldade no tratamento. Deixa-se claro que as superfícies dos implantes são mais difíceis de limpar do que as amostras de discos usadas nesta pesquisa. Neste estudo, a acessibilidade ideal para a superfície da amostra foi assegurada. Em situação clínica, defeitos, morfologia ou próteses adversas dificultam o acesso à região de interesse. Além disso, os discos não possuíam roscas ou outras estruturas que impedem o procedimento de limpeza.

A descontaminação ideal envolve desorganizar o biofilme formado e manter as características da superfície do implante,⁸² uma vez que, o potencial de osseointegração/reosseointegração é diretamente influenciado pela rugosidade e química da

superfície. O que ressalta a importância de serem mantidas as características das superfícies após o processo de descontaminação.⁸³ Para isso, faz-se necessários mais estudos a fim de se observar a interferência dessas alterações no processo de reosseointegração dos implantes.

6 CONCLUSÃO

Dentre os limites metodológicos deste estudo, pode-se concluir que a descontaminação utilizando métodos mecânicos em associação ao método químico demonstrou ter maior eficácia em relação ao uso de somente de um método químico, neste caso o EDTA gel 24%. A associação entre aparelho de ultrassom e EDTA apresentou melhores resultados em relação a capacidade descontaminante, porém, morfologicamente gerou maiores alterações na superfície de titânio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marcantonio, C. Avaliação da prevalência das doenças peri-implantares e do sucesso e sobrevivência de implantes osseointegrados com 8 a 10 anos de função. Faculdade De Odontologia De Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2014.
2. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein J. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. *Head Face Med.* 2014;10(34)
3. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3:81-100.
4. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. *J Clin Periodontol.* 1991;18:474–481.
5. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T. The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(2):170-83.
6. Listgarten MA. Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation. *Annals of periodontology.* 1997;2(1):299-313.
7. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence.* 2015;6(3):183-7.
8. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106(3): 721-64.
9. Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11 Suppl 1: 146-55.
10. Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S267-S290. doi: 10.1002/JPER.16-0350. PMID: 29926957.
11. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* 2018;45 Suppl 20:S286–S291.
12. Mancini L. Peri-implant health and diagnostic considerations. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19:12008.

13. Berglundh J, Romandini M, Derks J, Sanz M, Berglundh T. Clinical findings and history of bone loss at implant sites. *Clin Oral Implants Res* 2021;32:314–323.
14. Tomasi C, Derks J. Etiology, occurrence, and consequences of implant loss. *Periodontol* 2000. 2022;88(1):13-35.
15. Vignoletti F, Di Domenico GL, Di Martino M, Montero E, de Sanctis M. Prevalence and risk indicators of peri-implantitis in a sample of university-based dental patients in Italy: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol*. 2019;46(5):597-605. Schwarz F, Ramanauskaite A. It is all about peri-implant tissue health. *Periodontol* 2000. 2022;88(1):9-12.
16. Sahrman P, Gilli F, Wiedemeier DB, Attin T, Schmidlin PR, Karygianni L. The Microbiome of Peri-Implantitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms*. 2020 May 1;8(5):661. doi: 10.3390/microorganisms8050661. PMID: 32369987; PMCID: PMC7284896.
17. Freire MO, Sedghizadeh PP, Schaudinn C, Gorur A, Downey JS, Choi JH, Chen W, Kook JK, Chen C, Goodman SD, Zadeh HH. Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study. *J Periodontol*. 2011 May;82(5):778-89. doi: 10.1902/jop.2010.100263. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21222546; PMCID: PMC3496747.
18. Feres M, Figueiredo LC, Soares GM, Favari M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015 Feb;67(1):131-86. doi: 10.1111/prd.12075. PMID: 25494600.
19. Listgarten MA. Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation. *Annals of periodontology*. 1997;2(1):299-313.
20. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015;6(3):183-7.
21. Charalampakis G, Belibasakis GN. Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*. 2015;6(3):183-7.
22. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *Journal of dental research*. 2005;84(4):340-4.
23. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:167-81.

24. Berglundh, T.; Gotfredsen, K.; Zitzmann, N.U.; Lang, N.P.; Lindhe, J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: An experimental study in dogs. *Clin. Oral Implant. Res.* 2007, 18, 655–661.
25. Albouy, J.-P.; Abrahamsson, I.; Persson, L.G.; Berglundh, T. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: Clinical and radiographic observations. *Clin. Oral Implant. Res.* 2008, 19, 997–1002.
26. Renvert, S.; Polyzois, I.; Claffey, N. How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *J. Clin. Periodontol.* 2011, 38 (Suppl. S11), 214–222.
27. Cecchinato, D.; Parpaiola, A.; Lindhe, J. Mucosal inflammation and incidence of crestal bone loss among implant patients: A 10-year study. *Clin. Oral Implant. Res.* 2014, 25, 791–796.
28. Derks, J.; Håkansson, J.; Wennström, J.L.; Tomasi, C.; Larsson, M.; Berglundh, T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: Early and late implant loss. *J. Dent. Res.* 2015, 94, 44S–51S.
29. Carcuac, O.; Derks, J.; Abrahamsson, I.; Wennström, J.L.; Petzold, M.; Berglundh, T. Surgical treatment of peri-implantitis: 3-year results from a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2017, 44, 1294–1303.
30. Sousa V, Mardas N, Spratt D, Hassan IA, Walters NJ, Beltrán V, Donos N. The Effect of Microcosm Biofilm Decontamination on Surface Topography, Chemistry, and Biocompatibility Dynamics of Implant Titanium Surfaces. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 2;23(17):10033. doi: 10.3390/ijms231710033. PMID: 36077428; PMCID: PMC9456268.
31. Schwarz F, Jepsen S, Obreja K, Galarraga-Vinueza ME, Ramanauskaite A. Surgical therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2022 Feb;88(1):145-181. doi: 10.1111/prd.12417. PMID: 35103328.
32. Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009 Apr;42(4):335-43. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01514.x. Epub 2009 Feb 7. PMID: 19220516.
33. Beraldo et al.,2017; Carvalho, Camargo, Valera, Camargo, & Mancini, 2008; e outros, 2007; Mozayeni, Javaheri, Poorroosta, Ashari e Javaheri, 2009; Nasher et al., 2016
34. Bighetti Trevisan RL, Scatolin RS, Castro Raucci LMS, Raucci Neto W, Froner IC. Effects of EDTA gel and chlorhexidine gel on root dentin permeability. *Microsc Res*

- Tech. 2018 Feb;81(2):191-197. doi: 10.1002/jemt.22963. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29083081.
35. Abnave P, Mottola G, Gimenez G, Boucherit N, Trouplin V, Torre C, Conti F, Ben Amara A, Lepolard C, Djian B, Hamaoui D, Mettouchi A, Kumar A, Pagnotta S, Bonatti S, Lepidi H, Salvetti A, Abi-Rached L, Lemichez E, Mege JL, Ghigo E. Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host Microbe*. 2014 Sep 10;16(3):338-50. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.002. PMID: 25211076.
 36. Dall'Agnol C, Hartmann MS, Barletta FB. Computed tomography assessment of the efficiency of different techniques for removal of root canal filling material. *Braz Dent J*. 2008;19(4):306-12. doi: 10.1590/s0103-64402008000400004. PMID: 19180319.
 37. Sampaio JE, Campos FP, Pilatti GL, Theodoro LH, Leite FR. A scanning electron microscopy study of root surface smear layer removal after topical application of EDTA plus a detergent. *J Appl Oral Sci*. 2005 Sep;13(3):247-52. doi: 10.1590/s1678-77572005000300009. PMID: 20878025.
 38. Rokaya D, Srimaneepong V, Wisitrasameewon W, Humagain M, Thunyakitpisal P. Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment. *Eur J Dent*. 2020 Oct;14(4):672-682. doi: 10.1055/s-0040-1715779. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32882741; PMCID: PMC7536094.
 40. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*. 2003 Dec;36(12):810-30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2003.00754.x. PMID: 14641420.
 41. Ntrouka V, Hoogenkamp M, Zaura E, van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Nov;22(11):1227-34. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02085.x. Epub 2011 Feb 15. PMID: 21320167.
 42. Kotsakis G, Lan C, Barbosa J, Lill K, Chen R, Rudney J, et al. Antimicrobial Agents Used in the Treatment of Peri-Implantitis Alter the Physicochemistry and Cytocompatibility of Titanium Surfaces. *J Periodontol*. 2016;87:809-19
 43. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):135-8. doi: 10.1016/s0140-6736(01)05321-1. PMID: 11463434.
 44. Renvert S, Polyzois J. Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol* 2000. 2018;76:180-90.

45. Karring ES, Stavropoulos A, Ellegaard B, Karring T. Treatment of peri-implantitis by the Vector system. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Jun;16(3):288-93.
46. Ashnagar S, Nowzari H, Nokhbatolfoghahaei H, Yaghoub Zadeh B, Chiniforush N, Choukhachi Zadeh N. Laser treatment of peri-implantitis: a literature review. *J Lasers Med Sci.* 2014 Fall;5(4):153-62. PMID: 25653815; PMCID: PMC4281989.
47. Mettraux GR, Sculean A, Bürgin WB, Salvi GE (2016) Two-year clinical outcomes following non-surgical mechanical therapy of peri-implantitis with adjunctive diode laser application. *Clin Oral Implants Res* 27(7):845–849.
48. Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Mar;25(3):279-287.
49. Heitz-Mayfield LJ, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29 Suppl:325-45. doi: 10.11607/jomi.2014suppl.g5.3. PMID: 24660207.
50. Heitz-Mayfield LJA, Salvi GE, Mombelli A, Loup P-J, Heitz F, Kruger E, Lang NP. Supportive peri-implant therapy following anti-infective surgical peri-implantitis treatment: 5-year survival and success.
51. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Solá-Ruiz MF, Ferrer-García JC (2013) Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18(6):e869–876
52. Tavares L, Pavarina AC, Vergani CE, Avila E. The impact of antimicrobial photodynamic therapy on peri-implant disease: What mechanisms are involved in this novel treatment? *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;17:236-44.
53. Hakki, S.S., Tatar, G., Dundar, N. *et al.* The effect of different cleaning methods on the surface and temperature of failed titanium implants: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 32, 563–571 (2017).
54. Tong Z, Fu R, Zhu W, Shi J, Yu M, Si M. Changes in the surface topography and element proportion of clinically failed SLA implants after in vitro debridement by different methods. *Clin Oral Implants Res.* 2021 Mar;32(3):263-273. doi: 10.1111/clr.13697. Epub 2021 Jan 10. PMID: 33314381.
55. Tong Z, Fu R, Zhu W, Shi J, Yu M, Si M. Changes in the surface topography and element proportion of clinically failed SLA implants after in vitro debridement by

- different methods. *Clin Oral Implants Res.* 2021 Mar;32(3):263-273. doi: 10.1111/clr.13697. Epub 2021 Jan 10. PMID: 33314381.
56. Velusamy SK, Sampathkumar V, Ramasubbu N, Paster BJ, Fine DH. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colonization and persistence in a primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Oct 29;116(44):22307-22313. doi: 10.1073/pnas.1905238116. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31611409; PMCID: PMC6825321.
57. Rocuzzo, Bonino, Bonino, & Dalmaso, 2011; Rocuzzo, Gaudio, Lungo, & Dalmaso, 2016.
58. Hakki, S.S., Tatar, G., Dundar, N. *et al.* The effect of different cleaning methods on the surface and temperature of failed titanium implants: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 32, 563–571 (2017).
59. Sahrann, P., Ronay, V., Hofer, D., Attin, T., Jung, R. E., & Schmidlin, P. R. (2013). *In vitro* cleaning potential of three different implant debridement methods. *Clinical Oral Implants Research*, 26(3), 314–319. doi:10.1111/clr.12322
60. Oliveira EHS, Sakamoto MY, Carneiro G, Rankel VM, Soares GMS, Schwartz-Filho HO. Análise físico-química da superfície de titânio após tratamento químico de descontaminação com clorexidina: estudo *in vitro*. *Rev Odontol UNESP.* 2020;49:e20200075.
61. Sahm N, Becker J, Santel T, Schwarz F. Non-surgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine: a prospective, randomized, controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2011 Sep;38(9):872-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01762.x. Epub 2011 Jul 19. PMID: 21770995.
62. Sousa V, Mardas N, Spratt D, Hassan IA, Walters NJ, Beltrán V, Donos N. The Effect of Microcosm Biofilm Decontamination on Surface Topography, Chemistry, and Biocompatibility Dynamics of Implant Titanium Surfaces. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 2;23(17):10033. doi: 10.3390/ijms231710033. PMID: 36077428; PMCID: PMC9456268.
63. Rocuzzo M, Pittoni D, Rocuzzo A, Charrier L, Dalmaso P. Surgical treatment of peri-implantitis intrabony lesions by means of deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen: 7-year-results. *Clin Oral Implants Res.* 2017 Dec;28(12):1577-1583. doi: 10.1111/clr.13028. Epub 2017 Jun 18. PMID: 28626970.

64. Giffi R, Pietropaoli D, Mancini L, Tarallo F, Sahrman P, Marchetti E. The efficacy of different implant surface decontamination methods using spectrophotometric analysis: an *in vitro* study. *J Periodontal Implant Sci.* 2022 Dec 2. doi: 10.5051/jpis.2203500175. Epub ahead of print. PMID: 36731864.
65. Park JB. Application of enamel matrix derivative and deproteinized bovine bone for the treatment of peri-implantitis after decontamination with an ultrasonic scaler: A case report. *Medicine (Baltimore).* 2018 Nov;97(48):e13461. doi: 10.1097/MD.00000000000013461. PMID: 30508970; PMCID: PMC6283095.
66. Sahrman, P., Ronay, V., Hofer, D., Attin, T., Jung, R. E., & Schmidlin, P. R. (2013). *In vitro* cleaning potential of three different implant debridement methods. *Clinical Oral Implants Research*, 26(3), 314–319. doi:10.1111/clr.12322 .
67. Park, J.-B., Jang, Y. J., Koh, M., Choi, B.-K., Kim, K.-K., & Ko, Y. (2013). *In Vitro Analysis of the Efficacy of Ultrasonic Scalers and a Toothbrush for Removing Bacteria from Resorbable Blast Material Titanium Disks.* *Journal of Periodontology*, 84(8), 1191–1198. doi:10.1902/jop.2012.120369
68. Sousa V, Mardas N, Spratt D, Hassan IA, Walters NJ, Beltran V, et al. The Effect of Microcosm Biofilm Decontamination on Surface Topography, Chemistry, and Biocompatibility Dynamics of Implant Titanium Surfaces. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17).
69. Ntrouka V, Hoogenkamp M, Zaura E, van der Weijden F. The effect of chemotherapeutic agents on titanium-adherent biofilms. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:1227-1234.
70. Henderson E, Schneider S, Petersen FC, et al. Chemical debridement of contaminated titanium surfaces: an in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2013;71:957-964.
71. (Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment Dinesh Rokaya^{1,2} Viritpon Srimaneepong³ Wichaya Wisitrasameewon⁴ Manoj Humagain⁵ Pasutha Thunyakitpisal^{2,6})
72. Burgers R, Witecy C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical periimplantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):940-7.
73. Belibasakis GN, Manoil D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *J Dent Res.* 2021;100(1):21-8.
74. Patil, D.; Wasson, M.; Perumal, V.; Aravindan, S.; Rao, P. *Bactericidal Nanostructured Titanium Surface through Thermal Annealing Advances in Micro and Nano*

- Manufacturing and Surface Engineering*; Springer: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 83–92].
75. Hosseinpour S, Nanda A, Walsh LJ, Xu C. Microbial Decontamination and Antibacterial Activity of Nanostructured Titanium Dental Implants: A Narrative Review. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Sep 8;11(9):2336. doi: 10.3390/nano11092336. PMID: 34578650; PMCID: PMC8471155.
 76. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden F. Influence of mechanical instruments on the biocompatibility of titanium dental implants surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Jul;26(7):841-50.
 77. Bowers, K.T., Keller, J.C., Randolph, B.A., Wick, D.G. & Michaels, C.M. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 7: 1992;302–310.
 78. Kononen, M., Hormia, M., Kivilahti, J., Hautaniemi, € J. & Thesleff, I. Effects of surface processing on the attachment, orientation and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *Journal of Biomedical Material Research* 26: 1992; 1325–1341.
 79. Brunette, D.M. & Chehroudi, B. The effects of surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. *Journal of Biomechanical Engineering* 121: 1999; 49–57.
 80. Chehroudi, B., Gould, T.R. & Brunette, D.M. Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* 23: 1989; 1067–1085.
 81. Chehroudi, B., Gould, T.R. & Brunette, D.M. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research* 24: 1990; 1203–1219.
 82. Schwarz F, Jepsen S, Obreja K, Galarraga-Vinueza ME, Ramanauskaite A. Surgical therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2022;88(1):145-81.
 83. Schwarz F, Jepsen S, Obreja K, Galarraga-Vinueza ME, Ramanauskaite A. Surgical therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2022;88(1):145-81.