

Orlando Paulo Moreira Martins

Avaliação dos tecidos peri-implantares – caracterização de um modelo experimental em cães Beagle

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, especialidade de Patologia e Cirurgia, disciplina de Periodontologia, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra sob orientação do Prof. Doutor João Carlos Tomás Ramos e da Prof.^a Doutora Isabel Cláudia Masson Piores Baptista

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária,
especialidade de Cirurgia e Patologia, disciplina de Periodontologia.

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina
e à forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, § único).



Orientadores

Prof. Doutor João Carlos Tomás Ramos

Prof.^a Doutora Isabel Cláudia Masson Poiares Baptista



A elaboração deste trabalho decorreu em colaboração com:

I. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra:

- a) Área de Medicina Dentária;
- b) Laboratório de Tecidos Duros da Área de Medicina Dentária;
- c) Instituto de Microbiologia;
- d) Laboratório de Bioestatística e Informática Médica.

II. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro:

- a) Hospital Veterinário.



“Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter;
repugna-la-íamos, se a tivéssemos. O perfeito é desumano,
porque o humano é imperfeito.”

Fernando Pessoa
(Livro do Desassossego)



À Cristina e aos meus filhos Inês e Afonso
Por Tudo e por serem Tudo.

Aos meus pais
A quem devo o que sou.

A todos os meus.



Aos meus amigos.



AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação é o culminar de um longo e enriquecedor trabalho realizado por uma vasta equipa, onde as dificuldades, dúvidas e respostas foram surgindo e instigando o desenrolar do presente trabalho. O resultado final, patente nas páginas que se seguem, é o reflexo do contributo de várias pessoas a quem gostaria de exprimir o meu mais profundo agradecimento pela dedicação, sugestões, críticas e incentivos.

Ao Professor Doutor João Carlos Ramos agradeço os marcantes ensinamentos que me deu ao longo de todo este trabalho, desde a sua idealização até à sua conclusão. A sua tenacidade, dedicação, rigor e orientação científicos foram basilares para o presente resultado final. Agradeço com enorme gratidão e reconhecido privilégio a honra da sua amizade. O seu contributo para o meu crescimento científico e profissional foi e é fundamental.

À Professora Doutora Isabel Poiares Baptista, pela enorme disponibilidade e permanente fomento do rigor e espírito científico. A sua amizade e total empenho no desenvolvimento desta tese foram cruciais, apoiando-me e fazendo-me acreditar na sua conclusão. Esta tese é, em muito, o resultado da sua grandeza científica e humana. É com profunda gratidão e estima que lhe agradeço a confiança em mim colocada, disponibilidade para discutir ideias e o cuidado depositado nas correções para que esta tese tivesse a presente conclusão.

Ao Professor Doutor Sérgio Matos agradeço-lhe o apoio e constante disponibilidade para a discussão científica deste projeto. A excelência do seu raciocínio, pautado pela precisão científica e experiência clínica, foi determinante na discussão de algumas questões da presente tese. É para mim motivo de enorme gratidão e orgulho a sua amizade e confiança.

À Professora Doutora Maria Helena Figueiredo pela constante presença e enorme contributo científico para a elaboração do presente trabalho. Agradeço-lhe a amizade, o constante incentivo bem como a exatidão espelhada nas análises histológicas realizadas, fruto de uma experiência única e de um raciocínio científico ímpar.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas e restantes membros da equipa agradeço o profissionalismo, apoio e brilhantismo clínico e científico empregues no desenvolvimento da fase experimental, relacionada com o modelo animal, realizada no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

À Professora Doutora Teresa Gonçalves e Professora Doutora Célia Nogueira um enorme agradecimento pelo apoio na execução das análises microbiológicas, bem como pela disponibilidade para o enriquecimento científico da presente tese através da sua discussão.

À Dr^a Marta Mota agradeço-lhe a disponibilidade para a execução e explicação do procedimento laboratorial relacionado com a análise microbiológica.

Ao Dr. João Martins, incansável no apoio da análise histológica do presente trabalho. A sua dedicação e já elevado carácter científico engrandeceram o presente trabalho.

Ao Professor Doutor Francisco Caramelo e Professor Doutor Miguel Patrício pela total disponibilidade e incansável apoio na realização e compreensão da análise estatística.

À Maria João Pires e Sara Leitão pela disponibilidade e apoio diário na execução da fase experimental. A presença de ambas foi determinante para os resultados deste trabalho.

À Cláudia Brites pelo constante auxílio na execução da cirurgia experimental, recolha e organização de dados, bem como pela qualidade impressa no processamento histológico das amostras.

À Dr^a Daniela Santos Silva e Dr. Fernando Marques pelo constante apoio na recolha de dados e execução da fase cirúrgica deste modelo experimental.

Ao Dr. Humberto Abreu e Dr. Maurino Luís pela excelência do trabalho desenvolvido na fase experimental da presente tese.

À Dr^a Teresa Alcobia pela enorme prontidão e elevado profissionalismo empregues na recolha bibliográfica.

Ao Dr. Moisés Rocha pela disponibilidade e cooperação em etapas fundamentais do processo experimental.

À Dr^a Anabela Pedrosa pelo contributo para a adequada execução da fase experimental desta tese.

Ao meu colega de disciplina, Dr. Tony Rolo, pela amizade e companheirismo no exercício da atividade docente bem como pela ajuda nos momentos da minha menor disponibilidade no acompanhamento dos alunos.

Ao Vitor Monteiro pela ajuda na organização do *curriculum vitae*.

Ao Nuno Beirão pelo apoio na componente gráfica.

A toda a equipa da Clínica Médico-Dentária das Nogueiras, da Clínica de Medicina Dentária de Esgueira e da Orisclinic pela compreensão e apoio logístico nos meus momentos de ausência.

Aos alunos e ex-alunos da Área de Medicina Dentária que constituem um importante motivo da busca por um rigor e aperfeiçoamento contínuo, sendo uma enriquecedora fonte de sugestões e críticas no trabalho de docência.

Aos meus amigos, presentes nos bons e maus momentos, que contribuem para o meu enriquecimento e crescimento constantes.

A todos os colegas e funcionários que trabalham ou trabalharam no Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina, pelo constante incentivo e auxílio na execução deste trabalho.

Por fim não podia deixar de mencionar e agradecer a todos aqueles que, de forma indireta, contribuíram para o presente trabalho através da presença constante e apoio incondicional: a minha família e os meus amigos.

Aos meus avôs Nicolau e Manuel (*in memoriam*) pelo que ainda representam.

Aos meus pais, Ofir e Fátima, pelos valores, apoio, carinho e por sempre acreditarem em mim. São para mim um exemplo a seguir. O que sou devo-o a eles na totalidade.

À Cristina, meu eterno porto de abrigo, e aos meus filhos Inês e Afonso, agradeço tudo o que me deram e peço desculpa por tudo de que vos privei ao longo deste trabalho. A simplicidade e generosidade das vossas vozes, olhares, brincadeiras, beijos e abraços foram e são a minha força motriz. Esta tese é vossa!

Sumário

I – Introdução

I.1 – Doenças peri-implantares

I.1.1 – Mucosite e peri-implantite

I.1.2 – Prevalência e incidência

I.1.3 – Características clínicas e radiográficas,

I.2 – Modelos animais para estudo da peri-implantite

II – Avaliação crítica de modelos experimentais canídeos para estudo da peri-implantite

III – Estudo experimental

1 – Objetivos

2 – Materiais e métodos

3 – Resultados

4 – Discussão

5 – Perspetivas futuras

IV – Conclusões finais

V – Resumo

VI – *Abstract*

VII – Bibliografia

VIII – Anexos

IX – Índice geral



Capítulo I. Introdução



Estima-se que anualmente sejam colocados 12 milhões de implantes, a nível global¹. No entanto, como acontece em qualquer área da medicina, a sua taxa de sucesso não é de 100%. Um dos factores responsáveis pela existência destes insucessos é a presença de “Doenças Peri-implantares”.

As “Doenças Peri-implantares” compreendem dois tipos distintos de patologias que envolvem os tecidos que rodeiam e suportam o implante, nomeadamente os tecidos moles e o tecido ósseo. Em 1993, decorrente do 1st *European Workshop on Periodontology* (EWOP) Albrektsson & Isidor definem “Mucosite Peri-implantar” como sendo a reação inflamatória, reversível, dos tecidos moles que rodeiam um implante em função. Por outro lado a reação inflamatória com perda de suporte ósseo nos tecidos que circundam um implante em função foi apelidada de “Peri-implantite”². Posteriormente, nos 6th e 7th EWOP a mucosite peri-implantar foi clinicamente definida como a presença uma inflamação localizada em torno dos tecidos moles peri-implantares, associada a hemorragia à sondagem após leve sondagem (<0.25N) e possível edema. Por sua vez, a peri-implantite foi clinicamente definida como uma inflamação crónica com hemorragia à sondagem ligeira e aumento da profundidade de sondagem (PS), comparativamente à *baseline*. Da mesma forma, a perda óssea alveolar radiográfica, comparada à *baseline*, era típica da peri-implantite^{3,4}.

Na presente introdução, tendo em conta que este projeto tem por objetivo major a avaliação do modelo canídeo para estudo da peri-implantite, dar-se-á mais ênfase à situação clínica de peri-implantite.

I – Doenças peri-implantares

I.1 – Perspetiva histórica e critérios de diagnóstico

I.1.1 – Peri-implantite e mucosite peri-implantar

A “*péri-implantite*” foi pela primeira vez descrita há quase cinco décadas por Levignac⁵ para descrever a situação clínica relacionada com fenómenos de inflamação, presente em implantes justa ou endo-ósseos. Clinicamente, traduzia-se inicialmente pela presença de uma granulação marginal onde seria possível reconhecer, em maior ou menor grau, um exsudato. Posteriormente, esta lesão evoluía para uma bolsa peri-implantar, abcesso e fistulização⁵.

Em 1987, Mombelli *et al.*⁶ utilizaram o termo “*periimplantitis*” referindo que se tratava de uma infecção específica local na qual microorganismos, principalmente pertencendo ao grupo de bastonetes gram-negativos, desempenhavam um papel importante.

Poucos anos mais tarde, no 1st *European Workshop on Periodontology* (EWOP), em 1993, Albrektsson & Isidor² definem “Mucosite Peri-implantar” como sendo uma reação inflamatória com características reversíveis. Esta definição, já apresentada no início desta introdução, pode fazer subentender uma irreversibilidade da “peri-implantite”.

Em 1998, Mombelli & Lang⁷ realizam uma revisão da literatura relativa ao diagnóstico e tratamento da peri-implantite. De acordo com estes autores, a peri-implantite está associada a uma evidência radiográfica de destruição vertical da crista óssea, à presença de uma bolsa peri-implantar resultante daquela destruição óssea vertical, hemorragia à sondagem (HS) e eventual supuração (Sup) e presença ou não de edema tecidual. A dor não foi considerada como sintoma típico da peri-implantite. Segundo estes autores, o processo de decisão diagnóstica relativo à peri-implantite inicia-se com a sondagem peri-implantar. A presença ou ausência de placa bacteriana (PB) e HS nos tecidos peri-implantares são dois parâmetros adicionais a considerar. Se a PS obtiver valores superiores a 3mm há necessidade de realizar o diagnóstico diferencial discriminando-a de inflamações reversíveis dos tecidos moles peri-implantares sem perda de tecido ósseo de suporte (mucosite peri-implantar), de falhas primárias na obtenção de osteointegração ou de condições sem a presença de um componente inflamatório. Nestes casos, a radiografia está indicada para avaliar a extensão e morfologia do defeito ósseo peri-implantar. Nesta altura da decisão relativa ao diagnóstico de peri-implantite é indispensável a recolha de informação microbiológica de modo a decidir a aplicação local ou sistêmica de antibiótico⁷.

Alguns anos mais tarde, em 2001, Bragger *et al.*⁸ realizaram um estudo prospetivo randomizado de forma a compararem a prevalência das complicações biológicas, técnicas e insucessos, nas reabilitações orais fixas parciais sobre implantes, sobre dentes e mistas, sobre implante-dente, após 4-5 anos em função, bem como associar as complicações com fatores de risco. De modo a avaliarem as complicações biológicas definiram peri-implantite apenas com base em dois parâmetros clínicos: PS e HS. Os autores estabeleceram duas definições distintas para peri-implantite: numa primeira definição de peri-implantite consideraram valores de PS maiores ou iguais a 5mm e presença de HS; numa segunda definição consideraram valores de PS maiores ou iguais a 6mm e presença de HS⁸. Estes autores não descreveram a peri-implantite de forma clara e precisa, indiciando a dificuldade clínica existente para definir esta patologia.

Utilizando apenas estudos prospetivos longitudinais com um *follow-up* igual ou superior a 5 anos, Berglundh *et al.*⁹ realizaram uma revisão sistemática sobre a incidência de complicações biológicas e técnicas na reabilitação com implantes. Foram incluídos 51 estudos e, para além da informação sobre peri-implantite dada diretamente pelos autores dos artigos analisados, os critérios utilizados pelos autores da revisão para definir peri-implantite foram: PS superior a 6mm juntamente com HS/Sup e perda de inserção/perda tecido ósseo de 2,5mm. Apenas 52% dos artigos incluídos referem a frequência de implantes com sintomas de peri-implantite, e a maioria destes apenas com base em dados resultantes da sondagem peri-implantar. Nos estudos referentes a sobredentaduras, reabilitações totais e parciais fixas, 35-45% destes fornecem dados sobre a peri-implantite. No grupo de estudos referentes a reabilitações unitárias apenas 8 publicações reportaram dados sobre a presença/ausência de peri-implantite.

Os autores referem que os dados referentes à peri-implantite devem ser interpretados com bastante cautela pois os procedimentos de avaliação da mesma são inconsistentes entre estudos. Recomendam que no diagnóstico de peri-implantite se combine dados resultantes da sondagem peri-implantar e dos níveis de inserção clínica, incluindo HS/Sup, com a avaliação da perda óssea radiográfica⁹.

Em 2004 Karoussis *et al.*¹⁰ realizaram um estudo coorte prospetivo randomizado onde compararam as taxas de sobrevivência, de sucesso e de complicações, a 10 anos, em implantes com três desenhos diferentes.

Em 89 pacientes foram avaliados parâmetros clínicos e radiográficos, 1 e 10 anos após colocação dos implantes. A peri-implantite foi definida como a presença de uma PS maior ou igual a 5mm juntamente com HS e sinais radiográficos de perda óssea, sem no entanto quantificar a mesma. Estes autores concluem que devido à falta de critérios internacionais que definam as complicações biológicas, como a peri-implantite, haverá uma permanente discussão sobre esta patologia. Da mesma forma referem que o estabelecimento de critérios bem definidos é fundamental para a realização dos estudos e posterior comparação¹⁰.

Poucos anos mais tarde, em 2006, Roos-Jansaker *et al.*¹¹ desenvolveram um estudo transversal para avaliar a prevalência da peri-implantite em torno de implantes de titânio, que tenham estado em função entre 9-14 anos após colocação (média de 10,8 anos). Estes autores estabeleceram diferentes parâmetros, clínicos e radiográficos, para definir peri-implantite. Clinicamente esta definição assentou em parâmetros como a PS e HS, tendo por base quer o paciente quer o implante. Foram definidos três valores mínimos para a PS: maior ou igual a 4mm, maior ou igual a 5mm e maior ou igual a 6mm, sempre associada a HS. Definiram ainda aquela patologia tendo por base também critérios radiográficos e associaram aqueles valores clínicos a perda óssea radiográfica de 1-2, 3-4 ou maior ou igual a 5 espiras do implante. Por fim definiram como parâmetros clínicos a presença de HS e/ou Sup e, radiograficamente, uma perda óssea maior ou igual a 3 espiras (1,8mm), comparada com o ano anterior.

Estes autores referem que, nalguns casos, a perda óssea radiográfica de 3 espiras não estava associada a HS e/ou Sup pelo que não foi diagnosticada peri-implantite. Foi ainda referida a necessidade de avaliar a perda óssea tendo por referência um controlo prévio que sirva de base à comparação, bem como, na prática clínica, não se ter apenas a inflamação como referencia para o diagnóstico de peri-implantite. Por fim, tendo em conta o processo de remodelação óssea que ocorre durante a fase de cicatrização dos implantes, bem como possíveis erros ocorridos durante a realização de radiografias, os autores aconselham que, clinicamente, a peri-implantite seja definida tendo por base a HS e/ou Sup e perda óssea radiográfica maior ou igual a 1,8mm¹¹.

No ano seguinte, utilizando a mesma população do estudo anterior¹¹, Renvert *et al.*¹² avaliaram a microbiologia em implantes diagnosticados com peri-implantite ou mucosite e saudáveis. Clinicamente, a mucosite foi diagnosticada quando estava presente um quadro de PS maior ou igual a 4mm, presença de HS e uma perda óssea radiográfica inferior a 3 espiras (1,8mm). Quando verificavam a presença de HS e radiograficamente havia uma perda óssea maior ou igual a 3 espiras, estavam perante um quadro de peri-implantite. Relativamente ao estudo de Roos-Jansaker *et al.*¹¹ estes autores¹² não mencionaram a presença de supuração à sondagem.

Também tendo por base critérios radiográficos e clínicos, Maximo *et al.*¹³ avaliaram a presença de doenças peri-implantares em pacientes brasileiros, bem como a possível relação com a perda óssea periodontal, condição sistémica e perfil demográfico. Incluíram 113 pacientes desdentados parciais, não sujeitos a terapia periodontal de suporte, com implantes em função há pelo menos 1 ano. Os parâmetros clínicos avaliados foram a HS, a Sup, a PS e a hemorragia gengival marginal. Radiograficamente foi avaliada a perda óssea peri-implantar. Estes autores consideraram que estavam perante uma situação clínica de peri-implantite quando tinham uma PS maior ou igual a 5mm comcomitante com HS e/ou Sup. Adicionalmente, do ponto de vista radiográfico, havia perda óssea superior ou igual a 3 espiras. Estes autores referem ser importante a clarificação da definição de peri-implantite de forma a tornar os estudos comparáveis¹³.

Numa revisão da literatura realizada por Heitz-Mayfield¹⁴, a autora refere que os sinais clínicos de saúde peri-implantar incluem a ausência de hemorragia à sondagem e supuração bem como uma PS estável em relação a um ponto de referência fixo (ex: margem da coroa). De acordo com esta autora, o clínico deve realizar medições regulares da PS após terminar a reabilitação oral com a colocação da coroa. Assim, a sonda periodontal reveste-se de importância capital para o diagnóstico da saúde e doença peri-implantar. Os sinais clínicos de peri-implantite são uma PS superior a 5mm, HS e/ou Sup, todos obtidos com uma leve pressão na

sondagem (0,25N). Também é recomendado avaliar a presença de placa bacteriana e cálculos e, se necessário, realizar o controlo radiográfico¹⁴.

No mesmo ano de 2008 realizou-se o 6th EWOP de onde emanou uma revisão realizada por Zitzmann & Berglundh¹⁵. Nesta apenas foram incluídos estudos transversais e longitudinais onde estavam incluídos um mínimo de 50 pacientes com implantes em função há pelo menos 5 anos. Apesar dos autores seguirem a definição de peri-implantite emanada do 1st EWOP, em 1993, constataram que a mesma variava de acordo com os estudos incluídos. Assim, autores como Behneke *et al.*¹⁶ sugerem que a peri-implantite deve abranger a presença de sinais clínicos como HS, eritema, edema e pus, bem como a perda óssea progressiva (apesar de não definida em milímetros). Já para Ekelund *et al.*¹⁷ a peri-implantite é definida como uma combinação de inflamação, dor e contínua perda óssea. Por sua vez, Karoussis *et al.*¹⁰ e Ferreira *et al.*¹⁸ estabelecem como critérios de diagnóstico de peri-implantite a PS superior ou igual a 5mm, HS e/ou Sup bem como perda óssea radiográfica vertical. Critérios como presença de hemorragia ou supuração após sondagem bem como uma perda óssea radiográfica, após o primeiro ano em função, de 1,8mm foram utilizados para definir peri-implantite por Roos-Jansaker *et al.*¹¹, Laine *et al.*¹⁹ e Renvert *et al.*¹², como anteriormente descrito. Estes autores sugeriram que os implantes fossem avaliados clínica e radiograficamente.

Ainda no âmbito do 6th EWOP, Heitz-Mayfield¹⁴ realiza uma revisão sistemática onde analisa os parâmetros de diagnóstico relevantes para definir as doenças peri-implantares: mucosite peri-implantar e peri-implantite. Nesta revisão não é feita referência a mensurações quantitativas objetivas, mas antes é abordado o papel de vários parâmetros de forma a classificar aquelas patologias. De acordo com a autora, a sondagem peri-implantar é essencial para o diagnóstico das doenças peri-implantares, havendo uma relação entre a PS e a perda de inserção e de tecido ósseo. Da mesma forma, os tecidos peri-implantares são sensíveis à pressão exercida durante a sondagem peri-implantar, devendo esta ser aproximadamente 0,25N. A HS é indicativa da presença de inflamação nos tecidos peri-implantares e pode ser utilizada como factor preditivo da perda de tecido de suporte. A PS, presença de HS e de Sup devem ser avaliadas regularmente de modo a diagnosticar as doenças peri-implantares. Da mesma forma, as radiografias são necessárias como forma de avaliar o tecido ósseo de suporte em torno dos implantes. A análise do fluido crevicular peri-implantar não é considerado um parâmetro clinicamente útil para avaliar as doenças peri-implantares³.

Em 2010, Zetterqvist *et al.*²⁰ realizaram um estudo prospetivo, randomizado, de forma a determinar a existência de diferenças na incidência de peri-implantite entre implantes híbridos e “fully etched”. Os critérios estabelecidos para definir peri-implantite foram: mucosite com a presença de HS e/ou Sup à sondagem, PS superior a 5mm e perda da crista óssea progressiva, superior a 5mm, confirmada radiograficamente²⁰.

Em 2011, realizou-se o 7th EWOP e estabeleceram-se alguns consensos relativos à peri-implantite, particularmente numa revisão realizada por Lang *et al.*⁴. Nesta revisão, apesar de não se fornecerem valores quantitativos e objetivos relativamente a qualquer parâmetro, conclui-se que a avaliação clínica e a radiográfica devem ser rotineiramente obtidas após reabilitação com prótese. Desta forma estabelece-se um ponto de partida inicial para o diagnóstico de peri-implantite, durante a manutenção de implantes⁴.

Mombelli *et al.*, em 2012²¹, numa revisão da literatura referente ao tratamento cirúrgico da peri-implantite, refere que os sinais clínicos típicos desta patologia são: HS e/ou Sup após sondagem e PS igual ou superior a 5mm. O edema e eritema dos tecidos marginais peri-implantares são facultativos e, por norma, não há dor. O uso de radiografias, ou qualquer outro método, para avaliar a perda óssea marginal na interface implante-osso não é referido. No entanto, os mesmos caracterizam o defeito ósseo peri-implantar como sendo, normalmente, circunferencial. Os autores referem ainda que o diagnóstico diferencial da peri-implantite deve incluir a identificação de um possível problema subjacente, como seja a fratura de um componente ou um corpo estranho, mesmo em situações em que a presença de supuração aponte para uma infeção bacteriana. Para além disso, a perda óssea devido a infeção deve ser distinguida daquela que ocorre num processo normal de remodelação²¹.

No mesmo ano, Pjetursson *et al.*²², realizaram um estudo coorte retrospectivo cujo objetivo foi determinar a sobrevivência e sucesso de implantes em pacientes com história de doença periodontal e determinar a influência das bolsas residuais, no final do tratamento periodontal, na incidência da peri-implantite e perda do implante. Os autores criaram dois níveis de critérios para identificar peri-implantite: nível 1 definido por uma PS igual ou superior a 5mm e presença de HS; nível 2 definido por PS igual ou superior a 6mm e presença de HS. Adicionalmente, do ponto de vista radiográfico a peri-implantite foi definida como havendo uma perda radiográfica de osso marginal maior ou igual a 5mm, tendo o ombro do implante como referência, o que equivalia a uma perda óssea radiográfica de 2mm²².

Posteriormente, Froum & Rosen²³ propõem uma classificação da severidade da peri-implantite com base em critérios clínicos, como seja a HS e/ou Sup bem como a PS, e critérios radiográficos. Assim, os autores propõem classificá-la em “Inicial” se a PS for igual ou superior a 4mm, HS e/ou Sup e perda óssea radiográfica inferior a 25% do comprimento do implante; “moderada” se PS for superior ou igual a 6mm, HS e/ou Sup e perda óssea radiográfica entre 25%-50% do comprimento do implante; “avançada” se PS superior ou igual 8mm, HS e/ou Sup e perda óssea radiográfica superior a 50% do comprimento do implante²³.

Num recente EWOP, decorrido em 2012, Tomasi & Derks²⁴ realizaram uma revisão onde avaliaram a qualidade dos resultados bem como a metodologia da investigação clínica sobre a incidência, prevalência e fatores de risco das doenças peri-implantares. Foram incluídos 16 artigos na revisão e a peri-implantite foi abordada em 12 destes. Esta patologia foi clinicamente definida nestes 12 artigos como a presença de HS e/ou Sup com concomitante perda óssea radiográfica. Diferentes níveis de perda óssea foram definidos: 1) maior que 0,4mm desde o início de carga^{25,26}; 2) superior ou igual a 1,8mm detectada desde o 1º ano^{27,28}; 3) superior ou igual a 1,8mm detectado desde o exame feito há 1 ano^{13,19,29}; 4) superior ou igual a 2mm desde o início de carga²⁶; 5) superior a 2 mm desde a última avaliação radiográfica³⁰; 6) superior ou igual a 3mm desde a colocação do pilar³¹; 7) superior ou igual a 3mm desde o início de carga³² e 8) superior a 5mm²⁰.

Os autores de ambos os artigos anteriormente mencionados referiram ser evidente a existência de uma falta de uniformidade na definição dos critérios de diagnóstico desta patologia, bem como as consequências que tal facto trazia para os estudos clínicos^{23,24}.

Já em 2014 surgiu uma revisão sistemática que pretendeu analisar a literatura que descrevesse a etiologia e definição de peri-implantite. Para tal Pesce *et al.*³³ realizaram uma pesquisa de artigos relativos a estudos humanos e animais e incluíram 10 artigos na sua revisão, sendo 4 estudos clínicos e 6 estudos animais. Mediante os resultados obtidos, os autores afirmam que a definição de peri-implantite não é unanimemente empregue, sendo que a descrição clínica utilizada por alguns autores não é aceite por outros. Verificaram igualmente a presença de uma diferença entre autores no que concerne os valores quantitativos que definem os critérios analisados. Ainda de acordo com esta revisão, o valor da aplicação de parâmetros periodontais na monitorização de tecidos peri-implantares permanece pouco clara e longe de ser convincente. Da mesma forma, os artigos selecionados apresentam uma grande variabilidade no desenho do estudo, tornando uma meta-análise impossível. Os estudos microbiológicos incluídos na revisão não são unânimes sobre a flora encontrada nos locais peri-implantares portadores de patologia. No entanto, salvaguardam que foram aplicados diferentes métodos para recolha microbiológica, bem como foram analisadas diferentes superfícies de titânio. Da mesma forma, o método idel para recolha da amostra ainda não foi estabelecido. Estes autores afirmam ainda não ser possível assumir a etiologia bacteriana para a peri-implantite, apenas sublinhando a existência de uma correlação entre história de doença periodontal e peri-implantite. Sublinharam a distinção entre uma relação de correlação e uma relação de causa/efeito, uma vez que a primeira não implica necessariamente uma causalidade.

Como foi referido inicialmente a peri-implantite foi descrita pela primeira vez em 1965⁵. Passados quase 50 anos, ainda permanece a controvérsia em torno da sua definição corroborada pela inexistência de critérios clínicos e/ou radiográficos claros que a caracterizem.

Apesar de a mucosite ser considerada precursora da peri-implantite e estar associada à inflamação dos tecidos gengivais peri-implantares, a peri-implantite acarreta o adicional ônus da perda óssea peri-implantar. O consequente aumento da PS e respectiva relação com a patologia é, e muito dificilmente deixará de ser, motivo de discussão. No entanto, parece-nos ser transversal a todos autores a necessidade de controlar os implantes utilizando parâmetros clínicos que permitam monitoriza-los longitudinalmente, desde a altura da sua colocação e reabilitação com supraestrutura.

1.1.2 – Diagnóstico diferencial

Como já mencionado, não há consenso na definição de peri-implantite. Apesar da distinta forma de caracterizar a mesma patologia, por vezes há necessidade de realizar o diagnóstico diferencial com outras situações cuja perda óssea peri-implantar se deve a causas não infecciosas³⁴, como por exemplo a presença submucosa de cimento utilizado na cimentação da componente protética.

Ao cimentar uma coroa implanto-suportada o cimento pode extravasar para o sulco peri-implantar e originar eventos associados a lesões de corpo estranho. Estas infeções não são consequência directa de eventos microbiológicos mas sim de situações que podem favorecer o aparecimento de microorganismos patogénicos. A sua presença pode estar associada a sinais e sintomas clínicos semelhantes aos da peri-implantite, nomeadamente pus e hemorragia à sondagem. Nestes casos, as medidas anti-infecciosas *per se* não controlam a situação e o clínico tem necessidade de procurar outras causas subjacentes que não a puramente bacteriana.

Num estudo clínico, Wilson³⁵ demonstrou que o excesso de cimento estava associado a sinais clínicos e/ou radiográfico típicos de doenças peri-implantares em 81% dos 39 casos. Removido esse excesso de cimentos os sinais clínicos desapareceram em 74% dos casos. Porém, muitas vezes esse excesso de cimento não é detectado radiograficamente o que irá dificultar o diagnóstico diferencial³⁶.

Uma outra situação de perda óssea não infecciosa deve-se à colocação de implantes demasiado próximos entre si. Tarnow *et al.*³⁷ realizaram um estudo clínico radiográfico onde concluíram que, sempre que a distância mínima de 3mm entre a interface implante-pilar de dois implantes adjacentes não é respeitada, ocorre uma perda óssea horizontal superior à que ocorre quando aquela distância é maior. Estas medições radiográficas foram realizadas em implantes que tinham sido expostos e colocado o respetivo pilar de cicatrização, há mais de 1 e menos de 3 anos.

Outra situação merecedora de atenção para a realização do diagnóstico diferencial com peri-implantite é a colocação do pilar nos implantes “two-piece”. Neste tipo de implantes, a colocação do pilar protético está frequentemente associado a uma remodelação óssea durante as primeiras semanas, ocasionando uma perda óssea adjacente ao implante³⁸. Estas alterações na crista óssea marginal, ocorridas na fase inicial da cicatrização após colocação do implante, foram corroboradas por Hermann *et al.*³⁹. Estes autores verificaram que em implantes “two-piece” colocados a nível ou ligeiramente abaixo da crista óssea, quando expostos e colocado o respectivo pilar de cicatrização, ocorria a reabsorção apical da crista óssea marginal em 1,5-2 mm. Estes autores concluíram ainda que as alterações na crista óssea marginal não dependem da técnica submersa ou não-submersa. A perda óssea lateral ocorrida em torno de implantes “two-piece” após colocação do pilar foi corroborada por outros autores³⁷.

Igualmente, a colocação demasiado profunda dos implantes “one-piece”, não respeitando a crista óssea, pode levar a maior reabsorção da mesma. Tal ficou demonstrado num estudo clínico realizado por Hammerle *et al.*⁴⁰ em que, para além da normal reabsorção, implantes colocados mais infra-ósseos (mais 1 mm apical) estiveram associados a uma maior reabsorção óssea⁴⁰.

Noutro estudo desenvolvido poucos anos mais tarde, um outro grupo de investigadores concluiu que a localização da interface rugosa-polida na superfície de implantes “one piece” a nível da crista óssea ou 1 mm apical, determinará a localização do contacto mais coronal entre a superfície do implante e o tecido ósseo (*first bone to implant contact: fBIC*), corroborando os resultados anteriores³⁹.

Por outro lado, a perda óssea associada a más condições clínicas dos tecidos moles normalmente é autolimitada e não indica o início de peri-implantite³⁴.

Existem outras situações clínicas em que, embora haja um aumento da PS peri-implantar, não estamos perante uma peri-implantite. A sondagem peri-implantar pode ser influenciada pelo tipo e forma do implante, dos pilares e da supraestrutura protética. Uma PS superior a 3-4 mm nem sempre indica que estamos perante uma peri-implantite. O clínico deve ter sempre em atenção que as características morfológicas relacionadas com o implante, a interface implante-pilar bem como com a supraestrutura podem condicionar a PS e originar falsos positivos. Há a necessidade do clínico ter sempre presente aquelas características aquando da avaliação clínica.

De igual modo, o condicionamento dos tecidos moles, principalmente na zona estética, pode influenciar a PS. Muitas vezes o clínico, de forma a obter os melhores resultados estéticos, molda os tecidos moles peri-implantares criando a ilusão de uma papila interdentária. Tal pode resultar num aumento da distância entre o ombro do implante e a margem gengival. Gallucci *et al.*⁴¹ realizaram um estudo clínico onde colocaram coroas unitárias a 20 pacientes que foram clinicamente avaliados durante 2 anos. Concluíram que a adaptação dos tecidos moles, em mesial e distal das coroas, provocava uma deslocação desses tecidos para coronal, aumentando a distância entre o ombro do implante e a margem gengival até 5mm⁴¹.

I.2 – Prevalência e incidência

Os implantes endósseos são utilizados de forma rotineira na reabilitação oral de pacientes desdentados parciais e totais há mais de 25 anos¹⁵. Por vezes este tratamento está associado a complicações biológicas como a peri-implantite. Vários estudos apontam para prevalências e incidências díspares da peri-implantite. O cálculo de ambas depende, entre outros fatores, da definição de peri-implantite, não existindo entre os autores um consenso relativamente à sua definição, como já referido anteriormente.

O tipo de estudo ideal para avaliar a prevalência da peri-implantite deve ser o modelo transversal. No entanto, no caso de condições de natureza transitória ou que evoluem gradualmente, como o caso da peri-implantite, deve ser interpretado com cuidado e o seu valor para identificar corretamente os fatores de risco é limitado⁴², apesar de alguns autores não concordarem com esta limitação⁴³.

No que respeita à avaliação da incidência desta patologia, os estudos que a abordam devem ser prospetivos, com dados clínicos e radiográficos obtidos na *baseline*, com uma amostra corretamente selecionada e com a dimensão e método de amostragem corretos. Na opinião de Mombelli & Cionca³⁴ tal não acontece na totalidade de estudos analisados na revisão da literatura por eles realizada uma vez que todos eles apresentaram amostras de conveniência, vindas de centros clínicos e tratadas durante um determinado período de tempo. Da mesma forma, a maioria dos dados eram transversais ou recolhidos retrospectivamente.

Várias revisões narrativas e sistemáticas apontam, de uma forma aproximada, para a perda de 1 em cada 20 implantes num período de 10 anos e que fatores inerentes ao indivíduo como doenças sistémicas, hábito tabágico ou uma história de periodontite estão associados a prevalências mais elevadas de peri-implantite⁴⁴⁻⁵². No entanto, vários estudos apontam para diferentes prevalências da peri-implantite. A variabilidade na preva-

lência desta patologia pode ser explicada devido a diferentes fatores, um dos quais é a utilização de distintos critérios de diagnóstico. Este facto é notório em dois estudos distintos, mas que utilizaram a mesma população aplicando distintos critérios clínicos para definir peri-implantite, e obtiveram valores de prevalência de peri-implantite de 16%¹¹ e 55.6%¹⁵, tendo o paciente por base.

Um outro fator é a inclusão, ou não, de indivíduos com comprovado elevado risco, nomeadamente fumadores, pacientes com história de periodontite ou pacientes em terapia periodontal de manutenção^{9,53}.

Como já anteriormente referido o tipo de estudo apresenta-se como outro fator crucial para a validade dos dados publicados. De modo a conseguir-se obter informação suficiente sobre a prevalência da peri-implantite é preferível uma abordagem epidemiológica. Assim, a aplicação de estudos transversais está recomendada. Este tipo de estudo deve obedecer a pré-requisitos como o número adequado de pacientes (entre 100-500 pacientes) e a obtenção de dados clínicos e radiográficos. Devem igualmente estar focados na prática clínica privada de modo a transmitir a verdadeira efetividade dos tratamentos implanto-suportados¹⁵.

Desde 2002 até à atualidade já foram publicados algumas revisões sistemáticas relativas à prevalência e incidência da peri-implantite.

Em 2002 Berglundh *et al.*⁹ levaram a cabo uma revisão sistemática sobre a incidência de complicações biológicas e técnicas em implantes com pelo menos 5 anos de função, relatados em estudos longitudinais prospectivos. A frequência de implantes com sintomas de peri-implantite foi avaliada em apenas 29 dos 51 estudos, sendo que a maioria apresentava resultados com base na sondagem peri-implantar. Dos diferentes sistemas de implantes avaliados nem todos apresentaram dados sobre peri-implantite. A incidência de implantes que apresentavam peri-implantite variou de acordo com os grupos de tratamento: estudos com sobredentaduras⁵⁴⁻⁶⁰, reabilitações totais fixas^{58, 59, 61-64} e implantes unitários⁶⁵⁻⁷² apresentaram incidências de 0,6%, 0,71% e 0,31%, respectivamente, enquanto que estudos com reabilitações fixas parciais^{8, 67, 73-75} apresentaram valores de 6,47%, tendo o implante por base. Os autores referiram que a inconsistência dos métodos de avaliação dificultou a interpretação de dados sobre a incidência de peri-implantite. Foi assim recomendado que para o diagnóstico da peri-implantite fossem incluídos dados clínicos, nomeadamente profundidade de sondagem, nível de inserção, hemorragia à sondagem e supuração e dados radiográficos⁹.

Ao contrário da revisão anterior, Pjetursson *et al.*⁵³ realizaram uma revisão sistemática onde tiveram como unidade de análise o sujeito. Foi determinada a sobrevivência, aos 5 e 10 anos, de reabilitações orais parciais fixas e descreveram a incidência de complicações biológicas e técnicas. Foram incluídos 21 estudos com um total de 1336 reabilitações parciais fixas suportadas por 3578 implantes pertencentes a 5 sistemas diferentes. Só nove estudos^{8, 67, 73, 76-81} forneceram informações sobre complicações dos tecidos moles e peri-implantite, sendo a incidência de peri-implantite, após 5 anos, de 8.6% dos pacientes^{82, 83}.

Em 2012, Pjetursson *et al.* atualizaram a revisão sistemática realizada em 2004^{82, 83}. Nesta última publicação foram incluídos 32 estudos (22 prospectivos coorte e 10 retrospectivos), num total de 2100 pacientes reabilitados com implantes pertencentes a 9 sistemas distintos. Apesar de terem sido incluídos mais 8 artigos⁸³⁻⁹⁰ os resultados de incidência mantiveram-se nos 8,5%²². Uma das limitações desta última revisão é que 26 dos 32 artigos incluídos foram realizados num ambiente institucional (universidades ou centros especializados) e desta forma os resultados podem não ser adequadamente transpostos para a prática clínica privada de implantologia. Os autores recomendaram que as complicações biológicas devem ser definidas baseando-se na profundidade de sondagem, hemorragia à sondagem/supuração avaliadas em qualquer intervalo de observação bem como na crista óssea radiográfica comparada com a imagem obtida aquando da colocação da supraestrutura.

Tal como na revisão de Berglundh *et al.*⁹, Jung *et al.*⁹¹ publicaram uma revisão sistemática tendo o implante por base de análise. Foi descrita a incidência de complicações biológicas e técnicas em coroas unitárias, aos 5 anos. Nesta revisão foram incluídos 26 estudos, dos quais 21 prospectivos e 5 retrospectivos aos quais

corresponde uma totalidade de 1558 implantes pertencentes a 5 sistemas distintos de implantes. A incidência de implantes com perda óssea superior a 2mm foi referida em 10 estudos^{65, 70, 92-99} tendo sido de 6,3%.

No ano de 2013 surgiu uma revisão sistemática¹⁰⁰ e uma revisão sistemática e meta-análise¹⁰¹ relativas à prevalência de peri-implantite e mucosite peri-implantar.

Waal et al.¹⁰⁰ publicaram uma revisão sistemática com o intuito de avaliar as condições peri-implantares entre pacientes desdentados totais e parciais, nomeadamente a prevalência de peri-implantite. Foram incluídos para análise quantitativa 46 estudos. Os resultados desta revisão, tendo o sujeito por base, apontam para uma prevalência de peri-implantite, na ordem dos 10,7%-47,2% após um período de observação de 10 anos. Tendo por base o implante, estes valores variam entre 0%-3,4% após um período de observação de 5 anos, e 5,8%-16,9% após um período de 10 anos. De acordo com os autores, a peri-implantite ocorre com pouca frequência nos primeiros 5 anos após início de função do implante, sendo um problema frequentemente observado após este período. Da mesma forma, os autores referiram que devido aos diferentes critérios utilizados para definir as patologias não foi possível realizar uma meta-análise sobre a prevalência da mucosite peri-implantar nem da peri-implantite.

Uns meses mais tarde, em Novembro de 2013, Atieh et al.¹⁰¹ publicaram uma revisão sistemática e meta-análise sobre a prevalência das doenças peri-implantares na população em geral e em grupos de alto risco, com implantes em função há pelo menos 5 anos. Os resultados foram apresentados em função do implante e do sujeito. Os grupos identificados com elevado fator de risco foram pacientes com uma história de periodontite, fumadores ou diabéticos. Após identificação dos parâmetros clínicos que definem a peri-implantite, foram analisados nove artigos com 1497 pacientes e 6283 implantes. A maioria dos estudos incluídos foram realizados em meio universitário^{11, 18, 25, 27, 102-104}, com exceção de dois^{43, 105}, nos quais a colocação de implantes e terapia de manutenção foram realizados em clínicas privadas. Os períodos de observação variaram entre 5 a mais de 10 anos. Relativamente à mucosite peri-implantar, quatro estudos^{11, 18, 25, 43} foram incluídos para meta-análise, revelando uma prevalência de 63,4%, e 30,7%, tendo respetivamente os implantes e os participantes como objecto de estudo. No que concerne à peri-implantite foram incluídos 7 estudos^{11, 18, 25, 27, 43, 103, 105} para meta-análise. A prevalência de peri-implantite foi de 9,6% e 18,8% com base nos implantes e nos participantes, respectivamente. No sub-grupo de pacientes com história de periodontite a ocorrência de peri-implantite foi mais elevada: 21.1%, mas no sub-grupo de fumadores foi muito elevada, 36.3%. Para os pacientes colocados num programa de manutenção a frequência de peri-implantite foi a mais baixa, 14,3%. Nesta revisão foi detetada uma elevada heterogeneidade entre os estudos. Os autores sublinharam a importância destes estudos terem por base o paciente e não o implante pois dados que tenham o implante como unidade de análise podem subestimar a prevalência desta patologia.

Para além das revisões sistemáticas anteriormente apresentadas, recentemente, em 2008 e 2012, surgiram duas revisões da literatura emanadas de consensos decorrentes do 6th *European Workshop on Periodontology*¹⁵ e da 3rd *European Association for Osseointegration (EAO) Consensus Conference*¹⁰⁶. Nesta última, Mombeli et al.¹⁰⁶ reviram a literatura existente relativa à prevalência e incidência da peri-implantite. Todos os estudos incluídos (29 artigos correspondentes a 23 estudos) relataram dados provenientes de amostras de conveniência, isto é pacientes tratados em centros clínicos durante um determinado período de tempo e de acordo com determinados critérios de inclusão. Com base nos artigos incluídos, a prevalência de peri-implantite foi na ordem dos 10% para os implantes e 20% para os pacientes. Os autores referem que para o estudo da incidência de peri-implantite seriam necessários estudos adequadamente desenhados, os quais não existiam aquando da realização desta revisão.

De facto aquelas críticas vieram reforçar as anteriormente feitas por Zitzmann et al.¹⁵, os quais reportaram que os estudos transversais que abordam a prevalência de peri-implantite são raros e os resultados quase

sempre fornecidos em função dos implantes e não tendo por base o sujeito. Também a definição de peri-implantite variava consideravelmente entre estudos. Na revisão realizada por este grupo, apenas 9 publicações respeitaram os critérios de inclusão definidos. Estes estudos debruçaram-se sobre 6 populações distintas, tendo 3 estudos avaliado a mesma população. Foram analisados diferentes sistemas de implantes que estiveram em função entre 9-11 anos. No entanto, apenas 2 estudos transversais^{11,27} forneceram dados sobre a prevalência de peri-implantite, tendo esta sido avaliada em 28%²⁷ e 55,6-77,4%¹¹ dos indivíduos. Tendo o implante como base a sua prevalência foi de 12,4% a 43,3%¹⁵.

Decorrente do 6th EWP emanaram algumas recomendações para estudos futuros relativos à prevalência da peri-implantite, já anteriormente mencionados, nomeadamente a utilização de estudos transversais, uma amostra com dimensão apropriada (entre 100-500 sujeitos), estudos com populações provenientes de clínicas privadas e não do meio universitário, os sujeitos devem variar no género, idade, reconstruções suportadas por implantes, número de implantes e anos em função e ainda estudos que forneçam dados clínicos e radiográficos¹⁵. Apesar destas recomendações, após o ano de 2008 surgiram alguns estudos sobre prevalência desta patologia que apresentaram populações apenas universitárias ou mistas^{22, 104, 107} e/ou um número de pacientes inadequado^{43, 104, 105}.

No entanto, em 2012, Mir-Miri *et al.*⁴² realizaram um estudo transversal de modo a determinar a prevalência de doenças peri-implantares em 245 pacientes, observados na clínica privada e sujeitos a um programa de manutenção periodontal, reabilitados com 964 implantes de diferentes sistemas e com um tempo de função entre 1-18 anos (6,3±4,3). A peri-implantite foi diagnosticada sempre que radiograficamente se observava a exposição de 2 ou mais espiras, simultaneamente com a presença de HS ou supuração. A prevalência de peri-implantite determinada foi de 16,3% (12,2-22,5%).

Assim, após indicação emanada do 6th EWOP começam a surgir mais estudos com um desenho mais adequado para avaliar a real prevalência e incidência da peri-implantite, avaliando os pacientes do dia-a-dia. Estes pacientes, frequentadores das clínicas privadas e não das universitárias, constituem a real população de estudo.

1.3 – Parâmetros clínicos e radiográficos

O diagnóstico de uma patologia implica que a mesma possa ser compreendida com base em algumas das suas características chave e a informação daí retirada deve ter impacto na decisão a tomar sobre o seu tratamento⁷.

Vários parâmetros periodontais foram propostos para a prática clínica de forma a avaliar o estado de saúde peri-implantar¹⁰⁸. Uma análise clínica e radiográfica é recomendada para avaliar os tecidos marginais adjacentes a implantes dentários osteointegrados. Esta análise deve incluir parâmetros sensíveis que permitam a deteção de sinais e sintomas que se manifestem no início da infeção. Devido às condições clínicas a que a peri-implantite está associada, o instrumento de diagnóstico de escolha é a sonda periodontal e apenas secundariamente o exame radiográfico^{7, 109, 110}.

1.3.1 – Profundidade de sondagem peri-implantar

A sondagem periodontal é o parâmetro clínico mais utilizado para documentar profundidades de sondagem e perda de inserção periodontal¹¹¹.

A gengiva e a mucosa peri-implantar estão cobertas por um epitélio oral queratinizado, o qual é contínuo com o epitélio juncional voltado para o esmalte ou para a superfície do implante, com um comprimento aproximado de 2mm¹¹². O epitélio juncional da mucosa gengival bem como o epitélio juncional da mucosa peri-implantar encontram-se unidos à superfície do dente e implante, respectivamente, através de hemidesmossomas^{113,114}.

No implante, uma zona de tecido conjuntivo rica em colagénio mas pobre em elementos celulares¹¹⁵ separa a porção apical do epitélio juncional do osso alvéolar. Esta zona tem aproximadamente 1-1,5mm de extensão e, juntamente com o epitélio juncional, estabelece uma adesão implante-mucosa com aproximadamente 3-3,5mm de comprimento. As fibras de colagénio existentes neste tecido conjuntivo apresentam uma orientação predominantemente paralela à superfície do implante^{115, 116}, no entanto há autores que descrevem outras orientações¹¹⁷⁻¹¹⁹.

As dimensões que constituem a profundidade de sondagem fisiológica à volta dos implantes dentários osteointegrados é ainda matéria de debate. As diferenças, relativamente ao complexo dento-gengival, na composição dos tecidos moles bem como a ausência de uma adesão da mucosa peri-implantar a um cimento na superfície do implante, ajuda a justificar a distinção entre os complexos dento e implanto-gengival, no que respeita à sondagem clínica¹²⁰.

Num estudo animal, Ericsson e Lindhe¹²¹ demonstraram que as diferenças de tecidos em termos de composição, organização e adesão entre a gengiva e a superfície radicular por um lado e a mucosa peri-implantar e a superfície do implante, por outro, tornam as condições para a sondagem, em dentes e implantes, distintas. Os autores concluíram que a resistência oferecida à sondagem pelo complexo dento-gengival é superior à oferecida pela mucosa peri-implantar e, como tal, neste caso a penetração da sonda aproxima-se mais do tecido ósseo subjacente¹²¹.

Mais tarde, em 1997, Christensen *et al.*¹²² realizaram um estudo clínico em 37 pacientes sujeitos a terapia periodontal e mantidos num programa periodontal de manutenção. Foi determinada a profundidade de sondagem em implantes e dentes homólogos com uma mucosa peri-implantar clinicamente saudável. A profundidade de sondagem peri-implantar (PS) média (aproximadamente 2,25mm) foi cerca de 0,5mm superior à PS média dos dentes homólogos (aproximadamente 1,75mm), nas mesmas condições. Também as faces vestibular e lingual dos implantes obtiveram, de uma forma geral, uma PS 0,5-1,0mm mais baixa que as faces interproximais. A PS em torno dos implantes parece ser específica para o tipo de implante e dependente do acesso da sonda à região do sulco peri-implantar.

Vários estudos sugerem que em implantes osteointegrados saudáveis a penetração da sonda no sulco peri-implantar é de aproximadamente 3mm^{6, 38, 60, 123-125}, no entanto sistemas de implantes diferentes podem ter diferentes PS, todas elas consideradas normais¹²².

Tal como acontece nos dentes, a PS em implantes é afectada pelo estado dos tecidos peri-implantares^{126,127}.

A sondagem peri-implantar é essencial para o diagnóstico e monitorização da peri-implantite^{120, 128, 129}. Devido à sua reprodutibilidade e sensibilidade para detetar patologia peri-implantar^{122, 126} a sondagem destes tecidos tornou-se um parâmetro clínico frequentemente utilizado na monitorização dos implantes¹³⁰. Esta monitorização permite avaliar alterações da profundidade do sulco peri-implantar, presença de hiperplasia ou recessão gengival, de hemorragia à sondagem ou de supuração⁷.

A relação entre a penetração da sonda periodontal no sulco peri-implantar e a pressão de sondagem, a dimensão da ponta da sonda ou as condições dos tecidos moles peri-implantares foi motivo de preocupação e estudo por parte de vários autores, tornando-se evidente a sua influencia sobre a penetração da sonda periodontal^{121, 126, 127, 131}. Esta relação vai ser desenvolvida pormenorizadamente mais à frente neste ponto.

Também o possível efeito lesivo que a sondagem periodontal poderia ter sobre os tecidos moles peri-implantares, nomeadamente através da colocação em risco do selamento peri-implantar e, consequentemente

da integridade do implante, foi motivo de estudo por alguns autores. Etter *et al.*¹³⁰ desenvolveram um estudo animal com o intuito de avaliar o processo de cicatrização dos tecidos moles peri-implantares após uma sondagem clínica com pressão padronizada (0,2-0,25N) e diâmetro na ponta de 0,45mm. Cada implante foi avaliado clinicamente em distintos períodos de tempo, nomeadamente 7, 5, 3, 2 e 1 dias antes da eutanásia bem como imediatamente antes da mesma. Os resultados histológicos demonstraram que um dia após sondagem, uma nova adesão epitelial com cerca de 0,5mm já era evidente. Esta adaptação estava totalmente restaurada cinco dias após sondagem. Da mesma forma, observaram que a altura do tecido conjuntivo não era afetada pela sondagem e permanecia estável ao longo do tempo e a sondagem não induziu inflamação dos tecidos moles peri-implantares. Os autores concluíram que a sondagem peri-implantar, em condições tecidulares saudáveis, não inflige danos irreversíveis no selamento da mucosa peri-implantar.

No entanto, nem sempre as condições dos tecidos moles peri-implantares são normais. Por vezes os tecidos peri-implantares já são portadores de sinais clínicos evidentes de inflamação e têm que ser adequadamente diagnosticados e monitorizados.

De forma a avaliar a influência do estado dos tecidos peri-implantares na PS Lang *et al.*¹²⁶ desenvolveram um estudo animal em cães para determinar o nível histológico de penetração da sonda periodontal na mucosa peri-implantar saudável e inflamada. Em cada implante foram colocadas e fixadas duas sondas periodontais com uma pressão padronizada de 0,20N, uma na face mesial e outra na distal. Clinicamente, verificou-se que a PS foi superior nos implantes com peri-implantite quando comparados com os implantes com mucosite e saudáveis. Histologicamente demonstraram que as sondas identificaram o nível de adesão do tecido conjuntivo no grupo saudável e com mucosite, mas no grupo com peri-implantite a sonda excedeu, em média, aquele nível em 0,52mm. Os autores concluíram que a sondagem peri-implantar representa uma boa técnica para determinar o estado dos tecidos peri-implantares.

Schou *et al.*¹²⁰ desenvolveram um estudo animal em macacos, de forma a avaliar o efeito da sondagem dentária e peri-implantar perante distintas condições de saúde dos tecidos envolventes. A sondagem foi efetuada em implantes e em dentes com distintas condições de saúde dos tecidos envolventes: gengiva e mucosa peri-implantar saudável; mucosite/gengivite moderada; mucosite/gengivite severa e peri-implantite/periodontite. A profundidade de sondagem foi realizada com uma sonda eletrónica com ponta arredondada e com uma pressão de sondagem padronizada de 0,4N a 3mm e 0,3N a 9mm. Imediatamente antes da eutanásia dos animais as sondas foram colocadas e fixadas nos sulcos peri-implantares dos três grupos. Foi avaliada a PS clínica bem como a histológica, nos três grupos. A profundidade de sondagem clínica foi aumentando desde o grupo saudável até ao grupo com peri-implantite. Estes autores concluíram que a profundidade de sondagem em implantes e dentes é diferente e que uma inflamação dos tecidos marginais moderada estava associada a uma maior penetração da sonda à volta de implantes comparativamente com dentes.

Assim, de acordo com os estudos anteriormente referidos, o aumento do PS média nos locais com peri-implantite documenta que a sondagem peri-implantar representa um parâmetro clínico relevante para indicar a estabilidade ou as condições patológicas dos tecidos peri-implantares^{120, 126}.

Outro dos fatores a ter em conta aquando da sondagem periodontal é a pressão exercida durante a sondagem pois a pressão aplicada sobre a sonda periodontal influencia a magnitude da sua penetração. De facto, a pressão de sondagem influencia de forma diferente a sondagem peri-implantar e a sondagem periodontal. Mombelli *et al.*¹³² estudaram o efeito de diferentes pressões de sondagem, padronizadas, em 11 pacientes periodontalmente saudáveis, parcialmente desdentados, e reabilitados com 1 implante. Foi utilizada uma sonda periodontal de ponta redonda, com 0,4mm de diâmetro. Quer no implante, quer nos dentes, foram aplicadas pressões de sondagem de 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 1,25N. Os resultados do estudo sugerem que uma alteração na pressão de sondagem tem mais impacto na PS peri-implantar que periodontal. A influência da variação na pressão de sondagem é particularmente importante nas pressões mais reduzidas onde mesmo pequenas

alterações na pressão têm um considerável impacto na PS. No entanto, este resultado contradiz o obtido por Abrahamsson *et al.*¹³¹. Estes autores avaliaram a PS peri-implantar e dentária, numa situação de saúde dos tecidos envolventes, utilizando uma sonda periodontal padronizada com ponta de 0,4mm e com uma pressão de 0,2N. Concluíram que, em situações de saúde, a penetração da sonda periodontal nos tecidos moles nos dentes e implantes é semelhante, desde que aplicada pressão de 0,2N.

Num estudo clínico desenvolvido por Gerber *et al.*¹³³ avaliou-se a profundidade de sondagem e hemorragia à sondagem em implantes e dentes contra-laterais saudáveis, aplicando pressões padronizadas de 0,15N e 0,25N utilizando para tal uma sonda com diâmetro na ponta de 0,4mm. Todos os pacientes foram previamente tratados para a periodontite crónica ou gengivite e encontravam-se em terapia periodontal de suporte. Verificou-se que, nos implantes saudáveis, partindo de 0,15N e aumentando a pressão em 0,1N a PS aumentava 0,3mm, enquanto nos dentes saudáveis a PS era independente da pressão aplicada. Da mesma forma, a PS nos implantes era geralmente superior em cerca de 1mm comparativamente à dos dentes saudáveis. A justificação para esta diferença entre implantes e dentes pode estar relacionada com o selamento proporcionado pela mucosa peri-implantar, a qual pode ser mais sensível à penetração pela sonda do que a unidade dento-gengival *per se*^{126,131}. Os resultados do presente estudo parecem indicar que a pressão de sondagem de 0,15N possa ser o valor limite a ser aplicado.

A utilização de sondas periodontais com uma pressão constante e padronizadas foi avaliada clinicamente em tecidos peri-implantares^{122,134}. O reduzido sentido táctil que proporcionam pode ser um problema considerável quando utilizadas em implantes, comparativamente à sua utilização em dentes, devido à presença do ombro do implante, espiras, revestimento da superfície do implante e/ou supraestrutura¹²⁰. De facto a presença da supraestrutura, como demonstrado num estudo clínico de Serino *et al.*¹³⁵, afecta a PS em implantes com peri-implantite. Quando removida verificou-se uma elevada correlação entre a PS e a quantidade de tecido ósseo peri-implantar perdido. Este recente estudo vem corroborar uma das conclusões emanadas do 6th EWOP, onde Lang & Berglundh⁴ afirmaram que a sondagem peri-implantar é afectada por vários factores tais como perfil do pilar e anatomia da coroa⁴.

1.3.2 – Hemorragia à sondagem

A hemorragia à sondagem (HS) representa um parâmetro clínico definido como a presença de hemorragia visível após a penetração da sonda periodontal no sulco peri-implantar ou bolsa periodontal, utilizando uma pressão moderada¹³³. Trata-se de um parâmetro que reflete a resposta do hospedeiro a uma agressão.

No complexo dento-gengival, a HS está relacionada com a pressão aplicada pela sonda periodontal¹³⁶. Tal foi estabelecido quer para condições normais de saúde gengival onde o periodonto apresenta a dimensão regular¹³⁶ quer para pacientes com um periodonto reduzido mas saudável¹³⁷. Uma pressão de sondagem de 0,25N foi identificada como aquela onde se minimiza a percentagem de falsos positivos¹³⁶.

De forma a avaliar o efeito da pressão de sondagem sobre a HS, numa situação de saúde periodontal, Lang *et al.*¹³⁶ realizaram um estudo clínico onde incluíram 12 pacientes com excelente higiene oral. Utilizaram distintas pressões de sondagem padronizadas de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0N. O resultado demonstrou que a força aplicada na sonda periodontal, com uma ponta com 0,4mm de diâmetro, não deve exceder 0,25N. Foi também referido que o traumatismo dos tecidos gengivais saudáveis ocorre de forma frequente, o que pode contribuir para a presença de falsos positivos em termos de HS. Assim, a especificidade bem como o valor preditivo para a progressão da patologia deste parâmetro clínico é consideravelmente modesto. Esta conclusão veio corroborar outras anteriormente expressas por outros estudos^{138,139} e onde se concluiu que o valor preditivo positivo para a progressão da patologia era apenas de 6% enquanto o valor preditivo negativo era de 98%, o que torna

a ausência contínua de HS um parâmetro de confiança para prever a manutenção da saúde periodontal¹³⁹. Assim, apesar da HS ter um valor preditivo limitado para a progressão da patologia¹⁴⁰ a sua ausência indica, com elevada probabilidade, uma situação periodontal estável¹³⁹.

De acordo com o 7th EWOP os parâmetros clínicos que indicam a presença de doenças peri-implantar são HS e aumento na PS¹⁴¹. Estudos clínicos demonstram que o parâmetro chave para o diagnóstico de mucosite peri-implantar é a HS (pressão de sondagem inferior a 0,25N), enquanto que a peri-implantite é caracterizada por alterações no nível da crista óssea em conjugação com HS, com ou sem aumento concomitante da bolsa peri-implantar^{14, 15}.

O parâmetro HS foi amplamente utilizado em alguns estudos relativos à análise de várias características relacionadas com a peri-implantite, desde a sua prevalência e incidência até ao diagnóstico clínico^{11, 13, 18-20, 25-28, 30, 32}.

Apesar da HS ser utilizada para diagnóstico de doenças peri-implantares, de acordo com Ericsson & Lindhe¹²¹ a presença de hemorragia após sondagem, apesar de pouco frequente em tecidos periodontais saudáveis, encontra-se com frequência em tecidos peri-implantares saudáveis. De facto, de acordo com alguns investigadores¹⁸, ainda não está claramente definido se a HS em tecidos peri-implantares é um parâmetro válido para detectar a presença de doenças peri-implantares, havendo outros investigadores que sugerem que a mucosa peri-implantar pode ser mais sensível à pressão de sondagem causando mais hemorragia, quando comparados com dentes¹⁴². No entanto, de acordo com Lutebacher *et al.*¹⁴³ a HS aplicado aos tecidos peri-implantares resulta numa precisão de diagnóstico superior à aplicada aos tecidos que circundam o dente, sendo um parâmetro mais sensível nos implantes que nos dentes. A sua ausência indica a presença de uma mucosa peri-implantar saudável.

Num estudo clínico desenvolvido por Gerber *et al.*¹³³ foram avaliados a PS e HS em dentes e implantes saudáveis, quando se aplicavam pressões padronizadas de 0,15N e 0,25N. Aplicando uma pressão de sondagem de 0,25N, a HS média foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre dentes e implantes. Pelo contrário, aplicando uma pressão de 0,15N não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de HS média entre dentes e implantes. Os autores concluíram que a pressão de 0,15N pode representar o limite de pressão a ser aplicada nos tecidos peri-implantares de forma a evitar falsos positivos relativamente à HS e que a sondagem peri-implantar demonstra uma maior sensibilidade quando comparada com a sondagem do sulco gengival dentário.

Recentemente, Casado *et al.*¹⁴⁴ desenvolveram um estudo clínico, com 144 pacientes e 486 implantes, onde pretenderam avaliar se a HS estava diretamente relacionada com a presença de doenças peri-implantares. Verificaram a presença de HS em 20,1% dos locais examinados em pacientes saudáveis, em 100% dos locais de pacientes com mucosite e em 19,9% dos locais examinados em pacientes com peri-implantite. Este estudo demonstrou que, após o diagnóstico inicial de doenças peri-implantares, considerando outros parâmetros clínicos bem como radiográficos, a HS tornou-se secundária para a identificação da doença tendo em conta que uma mucosa saudável apresenta HS em 20% dos casos. Concluíram, assim que, *per se*, a HS não é um parâmetro fiável para diagnóstico de lesão peri-implantar¹⁴⁴.

O diagnóstico correto de doença peri-implantar ainda é difícil de realizar e é desconhecido se a presença de HS está associada a um risco acrescido de desenvolver peri-implantite. Uma revisão recente de Mombelli *et al.*¹⁰⁶ chama a atenção para o facto de a presença de falsos positivos associados a este parâmetro ser elevada. No entanto, isto não quer dizer que a monitorização da HS peri-implantar não tenha valor clínico¹⁰⁶.

1.3.3 – Supuração

A presença de pus é sempre sinal de infecção, com a decorrente destruição de um tecido^{14, 145}.

Em 2004, num relatório de consenso, a presença de supuração (Sup) em situações de peri-implantite foi identificada em alguns relatos de casos⁸².

Num artigo publicado em 2008, Lang¹⁴⁵ refere que, com grande frequência, a peri-implantite estava associada à formação de pus, visível após sondagem ou compressão dos tecidos peri-implantares. Assim, e de acordo com este autor, a formação de pus representa um sinal de diagnóstico específico para a presença de peri-implantite¹⁴⁵.

São vários os artigos que incluem, na definição das características clínicas de peri-implantite, a presença de pus^{11, 13, 18, 20, 25, 43, 87, 146, 147}, valorizando desta forma a sua presença enquanto critério de diagnóstico. Também no 7th EWOP, realizado em 2010, Lang *et al.*⁴ afirmam que a presença de supuração é uma característica comum nos locais com peri-implantite. Do mesmo modo, um recente relatório de consenso¹⁴⁸ chamou a atenção para a necessidade clínica de monitorizar regularmente os pacientes em busca de vários sinais de inflamação/infeção peri-implantar, entre os quais a supuração.

Dados semelhantes foram apresentados por Fransson *et al.*²⁸. O objetivo deste estudo clínico foi examinar um grupo de 82 pacientes e descrever as características clínicas dos tecidos peri-implantares, em relação à evidência radiográfica de uma história de perda óssea progressiva. Verificaram que 33% dos pacientes apresentava pus em pelo menos um dos implantes. Da mesma forma, a proporção de implantes com pus foi quatro vezes superior em pacientes com a perda óssea previamente definida do que naqueles que não a apresentava. Os autores concluíram que a frequência de pus, HS, “recessão” e PS superior ou igual a 6mm num paciente fumador, tem uma precisão de 69% na identificação de uma história de perda óssea progressiva.

Assim, de acordo com os estudos apresentados foi sugerida a inclusão do parâmetro clínico supuração na avaliação da saúde peri-implantar, uma vez que a sua presença indica a presença de infeção.

1.3.4 – Exame radiográfico

A preservação do osso peri-implantar marginal é crucial para a manutenção do implante⁷. Uma perda óssea radiográfica vertical inferior a 1,5mm durante o primeiro ano após colocação da prótese e inferior a 0,2mm por ano, após este período, é um dos critérios major para o sucesso do implante^{149, 150}.

Para a adequada monitorização da perda óssea peri-implantar há necessidade de efetuar, ao longo do tempo, radiografias padronizadas. Após a colocação definitiva da prótese fixa/supraestrutura sobre o implante deve ser realizado o primeiro controlo radiográfico. Este servirá de termo de comparação ao longo do tempo¹⁵¹. No entanto, devido a preocupações relacionadas com a exposição acumulada a radiação, os exames radiográficos não podem ser realizados de forma aleatória e muito frequente. Na ausência de sinais clínicos de infeção é recomendado realizar um exame radiográfico por ano⁷.

Assim, a radiografia deve ser encarada como um teste de confirmação que irá, ou não, corroborar uma suspeita de diagnóstico sendo que se trata apenas de um instrumento de diagnóstico secundário, a ser utilizado após sondagem peri-implantar. O seu valor é bastante específico na medida em que raramente resultam achados falsos positivos. No entanto, alguns falsos negativos são comuns com a interpretação radiográfica¹⁵¹ uma vez que a mesma apenas nos permite visualizar o tecido ósseo em ambas faces proximais do implante.

Porém nem todos os autores estão de acordo com este papel secundário do exame radiográfico. Recentemente, Casado *et al.*¹⁴⁴, num estudo clínico, detectaram que 56% dos locais afectados por perda óssea (peri-implantite) apresentavam uma mucosa saudável, o que em muitos casos não levaria o clínico a realizar exame radiográfico e assim não diagnosticando a peri-implantite¹⁴⁴.

A apresentação clínica e radiográfica de uma lesão peri-implantar depende da posição do implante na crista alveolar, da anatomia das estruturas envolventes e da severidade da lesão. As bolsas peri-implantares podem apresentar uma profundidade de sondagem considerável (PS>5mm) ou moderada-a-ligeira (PS≤5mm) associada a recessão da mucosa peri-implantar. Para além disso, as lesões peri-implantares podem estar asso-

ciadas a defeitos intra-ósseos, perda óssea horizontal ou a deiscências. Esta distinta morfologia, que pode ser transmitida pelo exame radiográfico, bem como as suas características clínicas, são determinantes na abordagem terapêutica a adotar. Assim, uma lesão peri-implantar severa com uma bolsa profunda muito provavelmente necessitará de um acesso cirúrgico de forma a aceder à superfície contaminada do implante, enquanto uma bolsa pouco profunda e com recessão da mucosa, pode ser tratada com sucesso através de uma abordagem não-cirúrgica¹⁵². O exame radiográfico apresenta-se como uma ferramenta para se obter uma reconstrução da lesão peri-implantar, sempre após a realização de um exame clínico.

Tal como acontece com a PS, também a mensuração da perda óssea vertical radiográfica e a sua relação com a peri-implantite, não é unanimemente aceite pela comunidade científica. Assim, diferentes limites de perda óssea radiográfica foram aplicados como critério na classificação de peri-implantite em distintos estudos:

- maior que 0,4mm desde a início de carga^{25,26};
- perda óssea detetável após comparação com exame radiográfico anterior já com 1 ano e nível ósseo maior ou igual a 1,8mm^{27,28};
- perda óssea superior ou igual a 1,8mm, desde o exame radiográfico anterior já com 1 ano^{11,13,19,29};
- maior ou igual a 2mm desde o início da carga²⁶;
- maior que 2mm desde o último exame radiográfico³⁰;
- maior ou igual a 3mm desde a colocação do pilar³¹;
- maior ou igual a 3mm desde o início da carga³²;
- maior que 5mm²⁰.

Atualmente ainda não há consenso quanto a este parâmetro imagiológico para diagnóstico da peri-implantite. Assim, o exame radiográfico tem um carácter secundário no diagnóstico da peri-implantite, sendo razoável a sua utilização apenas quando os sinais clínicos revelam a presença de uma lesão peri-implantar. As radiografias não devem ser incluídas na monitorização rotineira de implantes dentários¹⁵¹.

1.4 – Modelos animais para estudo da peri-implantite

A investigação centrada nos implantes dentários e realizada em diferentes animais permitiu a acumulação de um vasto conhecimento científico, principalmente nos últimos 20 anos. Na escolha da espécie animal deverá ser prestada uma atenção especial a aspetos como a ética, anatomia e procedimento cirúrgico.

As terapias reconstrutivas focadas no tecido ósseo peri-implantar tornaram-se necessárias para providenciar um suporte mecânico adequado para a colocação estável, carga e manutenção de implantes endo-ósseos¹⁵³. A perda daquele tecido ósseo é mimetizada em estudos pré-clínicos utilizando distintos modelos animais. Protocolos experimentais desenvolvidos no rato, no cão e no macaco demonstraram que a colocação de ligaduras numa posição submarginal, em dentes e implantes, promovem o estabelecimento de uma inflamação e destruição dos tecidos de suporte, quer periodontais quer peri-implantares¹⁵⁴⁻¹⁵⁷.

De seguida serão abordados alguns dos modelos animais mais utilizados em estudos relacionados com a patologia peri-implantar, sendo apresentados por crescente aproximação filogenética ao Homem.

1.4.1 – Rato

O rato é um animal de fácil manuseamento, com um custo acessível na aquisição e manutenção e com possibilidade de obtenção de um elevado número de animais provenientes da mesma ninhada. Estas características tornam-no um modelo animal apetecível. No entanto, apresenta-se como um modelo animal com limitada utilização em estudos relacionados com a cronicidade da patologia peri-implantar, a qual desenvolve um defeito peri-implantar. Neste animal, este tipo de defeito é criado cirurgicamente, o que lhe retira a vertente microbiológica e de lesão crónica associada. Da mesma forma, a ausência de susceptibilidade natural para o desenvolvimento de periodontite não permite uma acumulação microbiológica natural necessária para a etiologia da patologia¹⁵³.

No entanto, já foram publicados alguns estudos com este modelo. Especificamente, este modelo foi utilizado para a criação de defeitos cirúrgicos infra-ósseos, sem um componente microbiológico natural. Após a exposição da crista alvéolar maxilar, o leito implantar foi criado com recurso a uma broca de 1mm de diâmetro. O diâmetro apical de 1mm permite a fixação do implante e a porção coronal da mesma, com 2mm de diâmetro, permite a criação de um anel circunferencial entre o osso alvéolar e a superfície do implante¹⁵⁸. Este modelo pré-clínico, apesar de ter sido criado para a maxila, pode ser adaptado à mandíbula. No entanto, a avaliação do período experimental (tempo) deve ser determinado através de estudos pilotos uma vez que o osso mandibular, por ser mais denso, pode ocasionar a fratura dentária durante as correspondentes extrações prévias à colocação dos implantes¹⁵³. Da mesma forma, devido ao tamanho deste modelo animal, há necessidade de utilizar implantes endo-ósseos com dimensões particularmente pequenas como os utilizados por Karimbux *et al.*¹⁵⁸.

Freire *et al.*¹⁵⁹ utilizaram o rato com o objetivo de desenvolver um novo modelo animal que permitisse estudar a resposta do hospedeiro a implantes de titânio previamente colonizados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Este modelo foi desenhado para investigar aspetos específicos de patologias osteolíticas mediadas por biofilmes, tal como a peri-implantite, e não de modo a recapitular todo o processo da patologia. A inoculação de *Aa* foi acompanhada por sinais clínicos de inflamação peri-implantar bem como de perda óssea.

A peri-implantite envolve não apenas a mucosa mas também o tecido ósseo, podendo comprometer a osteointegração do implante¹⁵⁶. Implantes com um desenho que estimule uma cicatrização epitelial mais eficaz, podem aumentar de forma significativa a sua eficácia biológica. De modo a melhorar o selamento epitelial, e desta forma minimizar o risco de peri-implantite, torna-se necessário compreender o processo de cicatrização do tecido mole associado à colocação do implante. Atsuta *et al.*¹⁶⁰ utilizaram o rato para avaliar o potencial de um novo implante para aumentar e manter a adesão epitelial à superfície do mesmo. Após a extração dos primeiros molares maxilares direitos foram colocados os implantes. Ao longo de 16 semanas alguns animais foram eutanasiados e foi avaliado o processo de cicatrização e a formação do epitélio peri-implantar bem como a sua capacidade de selamento. Concluíram que o sistema de implantes testado melhorava o selamento epitelial na interface implante-tecido, aumentando a eficácia do implante.

A peri-implantite está associada à presença de bactérias na superfície do implante. Estudos microbiológicos *in vitro* demonstraram que esta superfície armazena contaminantes, especialmente lipossacarídeos^{161, 162}, que, quando libertados, intensificam a resposta inflamatória e alteram a camada de óxido superficial^{163, 164}. Recentemente, Salmeron *et al.*¹⁶⁵ utilizaram ratos para avaliar a resposta tecidual a diferentes métodos de tratamento de superfícies de implantes previamente contaminadas com biofilme oral humano. Discos de titânio previamente contaminados e sujeitos a descontaminação, foram colocados subcutaneamente e posteriormente foi avaliada a resposta tecidual, nomeadamente o grau de fibrose e a concentração de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs).

1.4.2. – “Mini-pig”

Apesar de não ser um modelo muito usado, alguns investigadores têm utilizado o “mini-pig” como modelo animal para estudar situações relacionadas com peri-implantite¹⁶⁶⁻¹⁶⁹.

O “mini-pig” é um animal omnívoro com movimentos mastigatórios semelhantes aos do homem, diferentes quer dos do rato quer dos simplesmente verticais do cão. O tamanho dos dentes é semelhante aos humanos¹⁷⁰. Trata-se de um animal relativamente resistente a infeções sistémicas, com as imunizações adequadas, e recetivo ao tratamento anestésico e cirúrgico¹⁷¹. O seu sistema imunitário e as características dos tecidos periodontais tornam este animal um modelo aceitável para estudos longitudinais relacionados com a microflora oral¹⁶⁹.

Assim, as alterações microbiológicas associadas à peri-implantite induzida por ligaduras foram estudadas por Hickey *et al.*¹⁶⁹. Posteriormente Singh *et al.*¹⁶⁸ utilizaram este mesmo modelo para avaliar a regeneração óssea após peri-implantite induzida experimentalmente por ligaduras.

A procura de modelos animais para estudo da peri-implantite tem levado alguns investigadores à procura de um melhor conhecimento da microflora oral do “mini-pig”¹⁶⁷. Em 2012, Mueller *et al.*¹⁶⁶ desenvolveram um protocolo experimental utilizando o “mini-pig” como modelo animal, de forma a clarificar a influência do manuseamento dos tecidos moles no desenvolvimento da infeção peri-implantar. Mais recentemente, este modelo animal foi igualmente utilizado para estudar a integração dos tecidos moles gengivais mandibulares a implantes com distintos tipos de colares transgengivais¹⁷². Adicionalmente, o seu maxilar superior também permite a colocação de implantes¹⁷³.

Os “mini-pigs” são igualmente utilizados para avaliar defeitos ósseos peri-implantares, criados cirurgicamente nos ossos cranianos, de modo a testar diversas modalidades de regeneração^{174,175}. Esta utilização deve-se ao facto dos seus ossos cranianos apresentarem uma taxa regenerativa semelhante à humana.

1.4.3 – Cão

Devido ao seu temperamento dócil e predisposição natural para a periodontite, os cães, em particular os da raça Beagle, são utilizados na investigação pré-clínica relacionada com progressão da doença periodontal, regeneração óssea guiada e implantes dentários¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Tal como nos humanos, elevados níveis de anaeróbios Gram negativos são encontrados na placa bacteriana em desenvolvimento nos cães Beagle¹⁸⁰.

Cães mantidos isentos de placa bacteriana, através de uma higiene oral meticulosa, apresentam uma gengiva clinicamente saudável. A etiologia da doença periodontal parece ser semelhante nos cães e nos humanos¹⁸¹. Nos cães, esta patologia inicia-se gradualmente quando eles são jovens e aumenta com a idade, progredindo cerca de cinco vezes mais rapidamente que nos humanos²⁸⁷.

A doença periodontal afeta cerca de 80% dos cães com 2 ou mais anos. As lesões periodontais espontâneas tipicamente manifestam-se após os 5 anos de vida. Para que a destruição periodontal ocorra mais cedo, os cães são alimentados à base de uma dieta mole, que promova a acumulação de placa bacteriana. Num estudo desenvolvido por Lindhe *et al.*¹⁸² verificou-se que, dois meses após ausência de higiene oral e com uma dieta mole, houve um aumento significativo da profundidade de sondagem a nível dos molares e pré-molares, local que apresentava maior quantidade de placa bacteriana. A utilização de ligaduras colocadas subgengivalmente, de forma traumática, pode acelerar este processo.

O Beagle é rotineiramente utilizado em protocolos experimentais devido à sua bem documentada resposta fisiológica¹⁸³. Para além da raça Beagle, também têm sido utilizadas outras raças como por exemplo o

Labrador¹⁷⁹. A utilização de cães Beagle para estudos relacionados com a peri-implantite iniciou-se na década de 90¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Sendo este o modelo animal em avaliação neste trabalho, o próximo capítulo apresenta uma revisão exaustiva do mesmo, no estabelecimento de lesões de peri-implantite.

1.4.4 – Primatas não-humanos

No desenho de um estudo experimental é muitas vezes vantajoso selecionar animais filogeneticamente semelhantes aos humanos. Os primatas não-humanos apresentam várias espécies tais como o macaco cinomolgo (*Macaca fascicularis*), macaco esquilo (*Saimiri sciureus*) e macaco rhesus (*Macaca mulatta*), sendo o *Macaca fascicularis* e o *Macaca mulatta* os mais utilizados na investigação peri-implantar e periodontal.

Apesar de diferentes espécies de primatas não-humanos serem utilizados na investigação pré-clínica relacionada com a peri-implantite, estes animais apresentam algumas condicionantes. A sua aquisição e manutenção revela-se bastante onerosa e a sua utilização tem sido, por motivos éticos, extremamente condicionada a nível europeu. A sua manutenção requer uma equipa familiarizada com este tipo de animal pois é bastante feroz. Adicionalmente, são bastante propensos a infeções e doenças sistémicas e colocam dificuldades no controlo da infeção e trauma pós-cirúrgico¹⁷⁶. A sua semelhança com a espécie humana, em termos anatómicos e biológicos torna-os apropriados para vários tipos de estudos, desde que a utilização de animais de laboratório seja um requisito e não haja espécies menores disponíveis. Devido ao aumento da criação destes animais em cativeiro, questões como a homogeneidade na idade, peso corporal e saúde oral são facilmente ultrapassadas¹⁵⁷.

Os primatas não-humanos têm estruturas orais semelhantes à humana e possuem uma tendência natural para acumular placa bacteriana, formar cálculos e desenvolver gengivite, no entanto têm profundidades de sondagem reduzidas. A organização das fibras de colagénio na gengiva e tecido conjuntivo periodontal também é semelhante à humana. A gengiva saudável é histologicamente indistinguível da humana e a alteração que ocorre na composição da placa bacteriana de uma situação de gengivite para uma inflamação mais avançada é, também, semelhante à humana. Muitas das características clínicas, histológicas, microbiológicas e imunológicas da inflamação marginal espontânea e experimental, na maioria dos primatas não-humanos, são semelhantes às ocorridas nos humanos^{157, 187-189}.

Os primatas não-humanos têm uma predisposição natural para a periodontite, no entanto esta ocorre numa fase mais avançada da sua vida e são assimétricas¹⁹⁰. O modelo original de periodontite induzida por ligadura em primatas não-humanos foi descrito por Caton & Kowalski¹⁹¹. Estudos iniciais relativos à indução de peri-implantite com recurso a ligaduras, em macacos, surgiram no início dos anos 90. Bragger *et al.*¹⁹² avaliaram a utilidade da radiografia digital subtrativa na avaliação da densidade óssea peri-implantar tendo para tal induzido em macacos, com recurso a ligaduras, periodontite e peri-implantite.

Schou *et al.*¹⁹³ avaliaram, durante 7 semanas de acumulação de placa bacteriana, a evolução clínica e radiográfica dos tecidos de suporte de um implante, de um dente anquilosado e de um dente numa situação clínica considerada saudável. Esta investigação esteve focada na fase inicial de destruição marginal. Verificaram que a presença de uma inflamação marginal num implante ou dente anquilosado conduz a uma perda significativa de osso. No dente com ligamento periodontal tal não ocorreu.

Também Lang *et al.*¹⁹⁴ utilizaram este modelo animal para avaliar o efeito da placa bacteriana, em conjugação ou não com ligaduras, nos tecidos periodontais e peri-implantares.

Em 1997, Fritz *et al.*¹⁹⁵, utilizando a *Macaca mulatta* sugeriram que, quer a periodontite quer a peri-implantite induzidas por ligaduras, seguem padrões destrutivos semelhantes, nomeadamente a alteração na microflora oral.

Outros grupos de investigação têm utilizado o macaco, particularmente a *Macaca fascicularis*, como modelo animal para estudos relacionados com a peri-implantite, nomeadamente na avaliação das características clínicas, radiográficas e histológicas de defeitos peri-implantares induzidos por ligaduras^{120, 196}, na microbiologia associada a este tipo de defeitos¹⁹⁷, no tratamento de defeitos peri-implantares resultantes da acção da ligadura com recurso a biomateriais^{187, 189, 198}, na preparação da superfície de implantes afectados por peri-implantite induzida por ligaduras¹⁸⁸, na influência da sobrecarga oclusal¹⁹⁹ e dos movimentos ortodônticos sobre os tecidos peri-implantares²⁰⁰ e no efeito da gengiva queratinizada sobre a inflamação dos tecidos peri-implantares²⁰¹.

Apesar da existência de alguns modelos animais para estudo da peri-implantite, a necessidade de avaliar a sua evolução crónica associada a implantes iguais aos utilizados na prática clínica exclui animais como o rato. Sabendo-se que filogeneticamente os primatas não-humanos se aproximarem da raça humana, questões legais e económicas restringem consideravelmente a sua utilização.

**Capítulo II. Avaliação crítica de modelos
experimentais canídeos para estudo
da peri-implantite**



I.1 – Objetivo

Realizar uma revisão bibliográfica organizada de forma sistematizada, de modo a efetuar uma análise crítica do modelo experimental canídeo utilizado para indução de peri-implantite.

I.2 – Estratégia de pesquisa

Para esta revisão foi efetuada uma pesquisa da literatura que incluiu artigos publicados até ao dia 10 de Fevereiro de 2014. A pesquisa foi efetuada nas seguintes bases de dados bibliográficas: uma primária (MEDLINE (PubMed) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), uma mista (EBSCOhost (<http://search.ebscohost.com/>) e uma secundária (Cochrane Library (<http://www.thecochranelibrary.com/view/0/view.html>)).

As palavras-chave pesquisadas foram: “peri-implantitis”, “periimplantitis”, “perimplantitis”, “animal”, “dog” e “canine”, combinadas com os operadores booleanos “AND” e “OR”, da seguinte forma: (“peri-implantitis OR periimplantitis OR perimplantitis) AND (“animal” OR “dog” OR “canine”).

Não foi ativado qualquer limite temporal relativo à data de publicação.

Na pesquisa na base de dados Medline foi ativado o filtro “Other animals” de forma a excluir estudos humanos.

Foi igualmente efetuada uma pesquisa seletiva em duas revistas científicas de referência da área, nomeadamente *Clinical Oral and Implants Research*, *Journal of Clinical Periodontology*, nos números publicados entre Janeiro de 1994 e 10 de Fevereiro de 2014.

I.3 – Critérios de inclusão e exclusão dos artigos

A seleção de estudos foi baseada nos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de Inclusão:

- publicações em revistas internacionais *peer-reviewed*
- artigos em língua Inglesa ou portuguesa
- estudos experimentais canídeos

Critérios de Exclusão:

- estudos com menos de 2 cães
- ausência de dados relativos à metodologia de indução de peri-implantite
- defeitos ósseos peri-implantares criados cirurgicamente em estudos com focus em peri-implantite.

I.4 – Resultados

Durante a pesquisa electrónica foram encontrados uma totalidade de 263 títulos e resumos potencialmente relevantes [MEDLINE (PubMed): 147 artigos; EBSCOhost: 83 artigos; Cochrane Library: 1 artigo; *Clinical Oral Implants Research*: 21 artigos; *Journal of Clinical Periodontology*: 11 artigos] (Fig. 2.1).

Após eliminação de artigos repetidos (80) permaneceram 183 referências.

Resultante da leitura dos títulos e resumos destes 183 artigos, por dois revisores, foram excluídos 120 artigos, permanecendo 63 com acesso integral ao texto.

Da sua leitura resultou a exclusão de 7 artigos (Tabela 2.1), resultando na seleção final de 56 artigos que obedeciam aos critérios pré-definidos (Tabela 2.2).

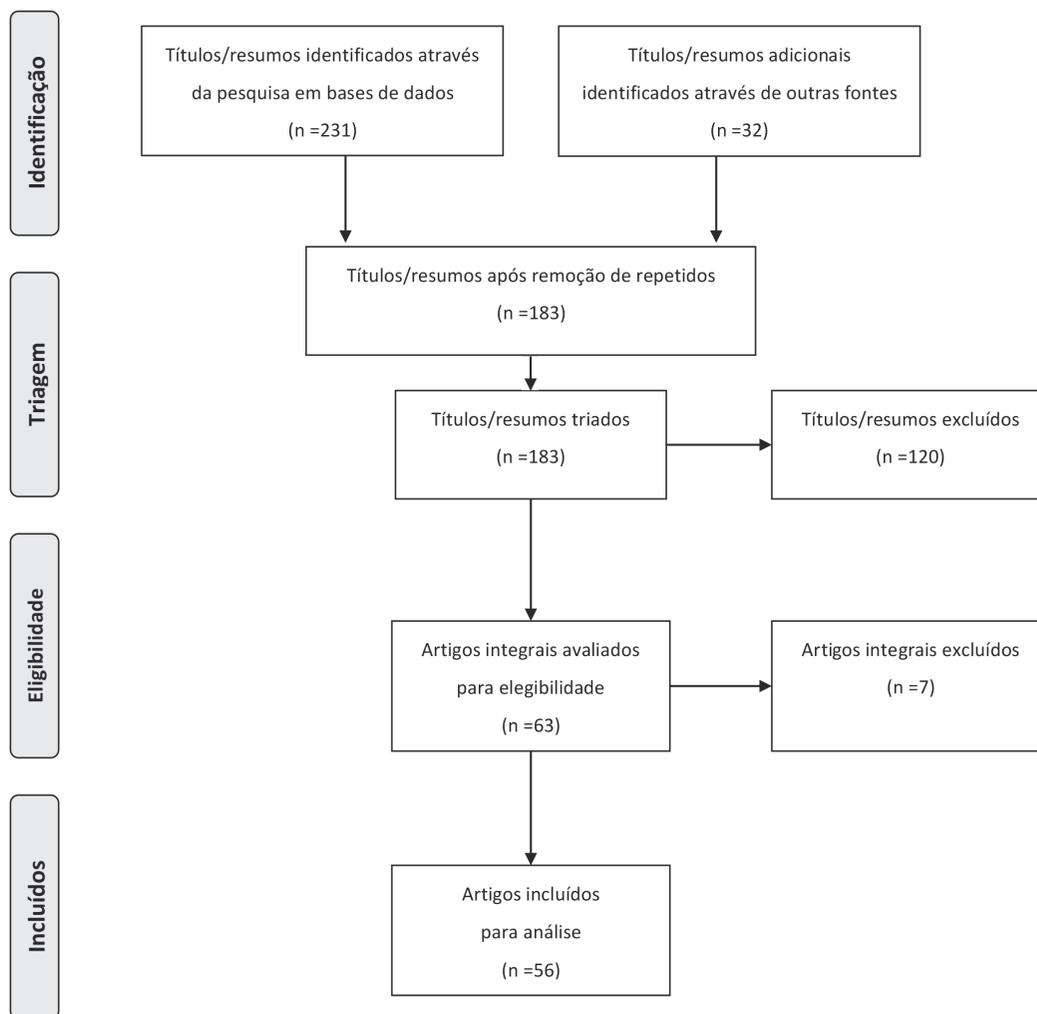


Figura 2.1 – Diagrama de fluxo da informação ao longo das diferentes fases da revisão, efetuado de acordo com a metodologia PRISMA. Adaptado de²⁰²

Tabela 2.1 – Lista de artigos excluídos após leitura integral dos mesmos.

Autores/Ano	Motivo da Exclusão
Bragger <i>et al.</i> 1991 ¹⁹¹	Não aborda metodologia indução PI
Mombelli & Lang 1998 ⁷	Não aborda metodologia indução PI
Borg <i>et al.</i> 2000 ²⁰³	Não aborda metodologia indução PI
Mombelli 2002 ¹⁶³	Não aborda metodologia indução PI
Assenza <i>et al.</i> 2006 ²⁰⁴	Não aborda metodologia indução PI
Takasaki <i>et al.</i> 2007 ²⁰⁵	Defeito peri-implantar criado cirurgicamente
Yamamoto <i>et al.</i> 2013 ²⁰⁶	Não aborda metodologia indução PI

PI: Peri-implantite.

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão

Autor/Ano	Raça (n.º) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controlo Placa Bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura				Período sem ligadura		Controlo Placa Bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite	Método de análise
		Dentes extraídos	Citri-zação (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Citri-zação (m)	Duração (m)	Método / periodicidade	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Ossea (%)	Acumulação extra de ligadura	Substi-tuição ligadura	Período (m)	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito ($\bar{x}\pm DP$) (mm)		
Grunder et al. 1993 ¹⁶⁵	Beagle (10) / 24	₃ PM ₁₋₂ -PM ₄	6	2 / 4	3	NR	NR	mole	Algodão (A)	5 (30%-50%)	NR	mensal	não	NR	NR	não	não	não
Schubbach et al. 1994 ²⁰⁷	Beagle (5) / 24	₃ PM ₃₋₄ -PM ₄	3	2 / 4	3	2	"oral hygiene"	mole	A	5 (30%-50%)	NR	mensal	não	NR	NR	não	não	não
Weber et al. 1994 ²⁰⁸	Beagle (2) / 18	₁ PM ₁₋₂ -PM ₄ +M ₁	3	5 / 10	3	NR	escova + gel 0,2% chx / diário	mole	Seda (S)	2	NR	NR	NR	2	ausência	não	CTR:67,74±1,39 TST:72,84±1,85	Rx
Lang et al. 1994 ¹²⁶	Beagle (5) / 72	₂ PM ₁₋₂ -PM ₄	4	3 / 6	2	2	escova mole 0,12% chx / 3x/semana	mole	S	4	mensal	não	não	4	ausência	não	PS (Cli.):4,26±0,65; mMPI-aEJ:3,8±0,77	Cli Htm
Cook & Rust-Dawicki 1995 ²³²	Mongrel (14) / 24-48	₁ PM ₁₋₂ -PM ₄	2	3 / 6	2	NR	NR	NR	S	NR	NR	não	não	NR	ausência	não	CSTI: 1,46±1,62(Lig-); 1,96±0,94(Lig+) HA: 1,26±1,23(Lig-); 1,64±0,39(Lig+)	Htm
Mari-nello et al. 1995 ¹⁸⁶	Labrador (5) / 12	₃ PM ₃₋₄ -PM ₄ +M ₁	3	2 / 4	6	6	escovagem dentes + implantes / diário	mole	A	1-1,5 (25%)	não	não	não	1-1,5	ausência	não	mMPI-CO:5,32±0,2 mMPI-aEJ:1,23±0,4	Htm
Hur-zeler et al. 1995 ¹⁸⁴	Beagle (4) / 36	₁ PM ₁₋₂ -PM ₄ +M ₁	3	3 / 6	3,5	NR	NR	mole	S	3 (30%-50%)	quinzenal-mente	não	não	NR	NR	não	não	não
Ericsson et al. 1996 ²⁰⁹	Labrador (5) / 12	₃ PM ₃₋₄ -PM ₄ +M ₁	3	NR/6	6	3	"tooth and abutment cleaning" / 3x/semana	mole	A	1,5-2 (20%)	não	não	não	4	ausência	não	mMPI-CO:3,48±0,55 mMPI-aEJ:2,70±0,5	Htm
Persson et al. 1996 ²⁵⁰	Labrador (5) / 12	₃ PM ₃₋₄ -PM ₄ +M ₁	3	3 / 6	NR	3	"tooth and abutment cleaning" / 3x/semana	mole	A	1,5 (20%)	não	não	não	4	ausência	não	não	não
Hur-zeler et al. 1997 ²⁰⁹	Beagle (7) / 36	₁ PM ₁₋₂ -PM ₄ +M ₁	3	3 / 6	3,5	NR	NR	mole	S	3	quinzenal-mente	não	não	3	ausência	não	não	não
Tillmanns et al. 1997 ²¹⁰	Beagle (14) / NR	₂ PM ₁₋₂ -PM ₄	3	3 / 6	4	NR	escova + "scaling" / 3x/semana	NR	A	3 e 6	não	"if neces-sary"	não	3	ausência	não	HA: 3,01±0,43(Lig-); 4,00±0,77(Lig+) TPS:3,06±0,77(Lig-); 3,70±0,60(Lig+) Ti-A:2,52±0,31(Lig-); 2,90±0,46(Lig+)	Cli
Tillmanns et al. 1998 ²¹¹	Beagle (14) / NR	₂ PM ₁₋₂ -PM ₄	3	3 / 6	4	NR	escova + "scaling" / 3x/semana	NR	A	3 e 6	não	"if neces-sary"	não	3	ausência	não	HA: 1,72±1,28(Lig-); 2,85±1,76(Lig+) TPS:1,46±0,90(Lig-); 2,21±0,94(Lig+) Ti-A:1,84±0,43(Lig-); 2,18±0,42(Lig+)	Htm

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão (continuação)

Autor/Ano	Raça (n°) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controlo Placa bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura				Período sem ligadura		Controlo Placa bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite	
		Dentes extraídos	Cicatrização (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Cicatrização (m)	Duração (m)	Método / periodicidade	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Óssea (%)	Acumulação extra de ligadura	Substituição ligadura	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito (x±DP) (mm)	Método de análise		
Wetzel et al. 1999 ²¹²	Beagle (7) / 48	₂ PM ₂ - ₁ PM ₁ + ₁ M ₁	5	NR / 41	3	3	"plaque control program"	NR	S	4 (40%)	mensais	não	não	3	ausência	TPS:3,22; SLA:2,77; M3,18	Htm	
Persson et al. 1999 ²¹³	Beagle (4) / 18	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	4	3 / 6	7	2	"tooth + abutment cleaning" / 2-2dias	NR	A	3 (50%)	mensais	não	não	3	ausência	HMEsq:3,37±0,20 HMDlr:3,54±0,67	Rx	
Machado et al. 1999 ²³³	Mongrel (4) / 24	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	3	2 / 4	3	NR	NR	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Machado et al. 2000 ²³⁴	Mongrel (5) / 24	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	3	2 / 4	3	NR	NR	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Nociti et al. 2000 ²³⁵	Mongrel (5) / 24-36	₂ PM ₂ - ₁ PM ₁	3	2 / 4	3,5	NR	"plaque control program"	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Çomut et al. 2001 ²¹⁶	Beagle (4) / 18	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁ + ₁ M ₁	NR	3-4 / NR	3	0,5	escovagem+gel chx 0,2%/diário	NR	S	4	não	não	não	não	4	ausência	Ti: 2,1±0,4(Lig-); 2,7±0,4(Lig+) PHA:2,2±0,3(Lig-); 2,9±0,4(Lig+) IBAD: 2,5±0,6(Lig-); 3,1±0,4(Lig+)	Cli
Nociti et al. 2001 ^{a236}	Mongrel (5) / 24	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	3	3 / 6	3,5	NR	NR	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Nociti et al. 2001 ^{b237}	Mongrel (5) / 24	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	3	2 / 4	3,5	NR	NR	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Nociti et al. 2001 ^{c238}	Mongrel (5) / 24-36	₂ PM ₂ - ₁ PM ₁	3	2 / 4	3,5	0,5	escovagem + colut. chx 0,12%/diário	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	PIc: 3,56±0,71	Cli	
Nociti et al. 2001 ^{d239}	Mongrel (5) / 24	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	3	3 / 6	3,5	NR	NR	mole	A	1	não	não	não	1	ausência	não	não	
Persson et al. 2001 ^{a251}	Labrador (2) / 12	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁ + ₁ M ₁	3	4 / 8	5	NR	NR	mole	A	3-4 (50%)	não	não	não	1	ausência	não	não	
Persson et al. 2001 ^{b215}	Beagle (4) / 12	₁ PM ₁ - ₁ PM ₁	12	3 / 6	3	3	escovagem dentes + implantes / 2x/semana	NR	A	3 (50%)	mensais	não	não	3	ausência	M3,1±0,5 (perda óssea); SLA 3,2±0,3 (perda óssea)	RX	
Shibutani et al. 2001 ²¹⁴	Beagle (10) / NR	PM ₂ -PM ₃	6	2 / 2	6	0,75	escova mole + colut. 0,2% chx / 1x/semana	NR	S	4	não	não	não	NR	NR	CTR:2,41±0,48 TST:1,59±0,55	Rx	

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão (continuação)

Autor/Ano	Raça (n°) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controlo Placa bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura				Período sem ligadura		Controlo Placa bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite	
		Dentes extraídos	Cicatrização (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Cicatrização (m)	Duração (m)	Método / periodicidade implantes/diária	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Ossea (%)	Acumulação extra de ligadura	Substituição ligadura	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito (x±DP) (mm)	Método de análise		
Deppe et al. 2002 ²¹⁸	Beagle (6) / 24	NR	NR	5 / 10	NR	1	"oral hygiene"	NR	A	3	não	não	3	ausência	não	não		
Godfredsen et al. 2002 ²¹⁷	Beagle (5) / 36-48	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	3	3 / 6	3	2,5	escovagem dentes + implantes/diária	NR	A	4 (40%)	não	mensal	4	ausência	Rx mPOM:2,6 (Lig+)(4m) mPOM:0,5 (Lig-)(3m); Htm:mMPI-CO:5,26±1,02 mMPI-aEj:3,92±1,27	Rx Htm		
Shibli et al. 2003 ^{a,240}	Mongrel (6) / 24	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	3	NR	5	2	"plaque control program"	NR	A	2 (40%)	20-20 dias	não	2	ausência	TPS:5,86±2,24; HA:5,52±0,73;AE:4,68±1,39; cpTi:3,26±1,58	Htm		
Shibli et al. 2003 ^{b,241}	Mongrel (6) / 24	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	3	NR	4,5	4,5	chx 0,12%	mole	A	2 (40%)	20-20 dias	não	2	ausência	TPS:1,79±1,52; HA:1,94±1,59;AE:1,62±1,32; cpTi:2,09±1,70	RX		
Shibli et al. 2003 ^{c,242}	Mongrel (6) / 24	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	3	NR	5	2	"plaque control program"	NR	A	2 (40%)	20-20 dias	não	2	ausência	não	não		
Martins et al. 2004 ²⁴³	Mongrel (6) / 24	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	3	3 / 6	4,5	NR	NR	NR	A	2 (40%)	20-20 dias	não	NR	NR	TPS:3,02±0,63 (PS) 3,50±0,97(Rx); HA:3,76±0,56(PS) 4,20±0,47(Rx); AE:3,83±0,62(PS) 3,70±0,57(Rx); cpTi:3,58±0,51(PS) 3,92±0,61(Rx)	Cli Rx		
Persson et al. 2004 ²¹⁹	Beagle (4) / 12	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	12	3 / 6	3	3	escovagem dentes + implantes / 2x/semana	NR	A	3 (50%)	não	não	não	NR	não	não	não	
Zechner et al. 2004 ²²⁰	Beagle (8) / NR	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄ + ⁱ M ₁	3	3 / 6	4	4	escovagem com gel chx 0,2% / 3-4x/semana	NR	Poliester + Aço Inoxidável	4	não	não	4	ausência	não	não	não	
Zitzmann et al. 2004 ²⁵²	Labrador (5) / 12	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄ + ⁱ M ₁	3	2-3 / NR	9	5	escovagem dentes + implantes/1x dia / 5 dias por semana	NR	A	2 (40%)	não	15-15 dias	2	ausência	RX: mPOM:2,58±0,39(Lig+)(2m) mPOM:1,02±1,62(Lig-)(12m); Htm:mMPI-CO:5,66±1,24 mMPI-aEj:1,35±0,58	Rx Htm		
Hayek et al. 2005 ²⁵³	Labrador (9) / 48	³ PM ₅	0	1 / 2	3	NR	NR	NR	NR	4 ⁴ (25%-30%)	não	não	4	ausência	não	não	não	
Sennerby et al. 2005 ²²¹	Beagle (4) / NR	ⁱ PM ₁ - ⁱ PM ₄	12	3 / 6	3	3	escovagem dentes + implantes / 2x/semana	NR	A	3	não	21-21 dias	NR	NR	SLA:6,7±0,91 (Rx) 6,23±0,73(Htm); M: 6,1±0,22(Rx) 5,66±0,25(M)	Rx Htm		

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão (continuação)

Autor/Ano	Raça (n.º) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controlo Placa Bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura			Período sem ligadura (m)	Controlo Placa Bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite				
		Dentes extraídos	Cicatrização (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Cicatrização (m)	Duração (m)	Método / periodicidade	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Óssea (%)	Acumulação extra de ligadura		Substituição ligadura	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito (x±DP) (mm)	Método de análise		
Martins et al. 2005 ²⁴⁴	Mongrel (6) / 24			3		NR	4,5	1,5		NR	A	2	20-20 dias	não	12*	NR	NR	(2 meses*)(Lig+) TPS:4.58±0.86(PS) 6.00±0.70(Rx); HA:5.16±0.37(PS) 6.22±0.50(Rx); AE:5.16±0.37(PS) 6.22±0.50(Rx); cpTi:4.85±0.82(PS) 6.32±0.33(Rx) (12 meses*)(Lig+/Lig-) TPS:4.40±1.14(PS) 6.77±1.38(Rx); HA:5.66±0.76(PS) 7.07±0.72(Rx); AE:5.75±1.50(PS) 6.80±0.80(Rx); cpTi:3.80±1.30(PS) 6.92±0.22(Rx)	Cli Rx
Shibli et al. 2006 ²⁴⁵	Mongrel (5) / 24			3		4 / 8	5	5		NR	A	3 (40%)	não	não	2*	ausência	não	não	
Schwarz et al. 2006 ²²²	Beagle (5) / 72			4		3 / 6	3	3		mole	A	3 (40%)	não	21-21 dias	1	ausência		CNS: 5.0±1.2(ERL)(Rx); 4.9±0.7(VUS)(Rx); 5.0±0.6(PCM)(Rx) OS: 5.6±1.0(ERL)(Rx) 5.3±1.4(ERL)(Cli); 5.5±1.0(VUS)(Rx) 5.1±0.8(VUS)(Cli); 5.9±1.3(PCM)(Rx) 5.3±1.1(PCM)(Cli)	Rx Cli
You et al. 2007 ²⁴⁶	Mongrel (6) / NR			3		3 / 6	3	NR		NR	fio + gaze	2-4/n.r	não	n	não	NR	n.r	não	
Schwarz et al. 2007 ²²³	Beagle (5) / 72			4		3 / 6	3	3		mole	A	3 (40%)	não	21-21 dias	1	ausência		Cli le:86.6%; Cli la:6.7%; Cli lc:6.7%; Cli lb:0%; Cli ld:0%	Cli
Berglundh et al. 2007 ²²⁴	Beagle (5) / 36-48			3		3 / 6	3.5	3		escovagem dentes + implantes / diário	A	4 (40%)	não	15-15 dias	5**	ausência		SLA: 6.11±2.67(mMPI-cOI) (Htm.) 5.73±0.55(Lig+)(Rx) 6.86±1.46 (Lig+-Lig-)(Rx) PHA: 4.5±0.88(mMPI-cOI) (Htm.) 5.54±0.96(Lig+)(Rx) 5.61±0.88 (Lig+-Lig-)(Rx)	Rx Htm

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão (continuação)

Autor/Ano	Raça (n°) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controle Placa Bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura				Período sem ligadura (m)		Controle Placa Bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite	
		Dentes extraídos	Citri-zação (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Citri-zação (m)	Duração (m)	Método /periodicidade	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Óssea (%)	Acumulação extra de ligadura	Substi-tuição ligadura	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito (x±DP) (mm)	Método de análise		
Kozlovsky et al. 2007 ²⁵	Beagle (4) / 24	3	3	4 / 8	3,75	0,75	plares escovados com 0,2% chx gel	NR	A	12	não	não	n.r	ausência	U1: 7,16±1,14(PS); 5,49±1,08 (OI-cOI)	Cli Htm		
Albouy et al. 2008 ²⁴	Labrador (6) / 12	3	3	4 / 4	3	2,5	escovagem implantes + dentes / diária	NR	A	3 (40%-50%)	não	21-21 dias	3	ausência	M: 3,53±1,04(Lig+) 1,84±1,41(Lig-) TIObl: 4,19±0,63(Lig+) 1,72±1,25(Lig-) SLA: 4,69±0,52(Lig+) 1,55±0,68(Lig-) TiUn: 3,58±0,37(Lig+) 2,78±1,91 (Lig-)	Rx (mPOM)		
Martines et al. 2008 ²⁶	Beagle (5) / 18-30	3	3	4 / 8	4	NR	NR	NR	A	3	não	não	3	ausência	não	não		
Albouy et al. 2009 ²⁵	Labrador (6) / 12	3	3	4 / 4	3	2,5	escovagem implantes + dentes / diária	NR	A	3 (40%-50%)	não	21-21 dias	3	ausência	M: 7,44±2,92(mMPI-cOI) 3,10±1,64(mMPI-aEJ) TIObl: 7,77±1,38(mMPI-cOI) 1,72±1,25(mMPI-aEJ) SLA: 7,48±1,35(mMPI-cOI) 4,70±1,19(mMPI-aEJ) TiUn: 8,67±2,92(mMPI-cOI) 4,15±1,56(mMPI-aEJ)	Htm		
Parlar et al. 2009 ²⁷	Mongrel (9) / NR	3	3	3 / 6	2	NR	NR	mole	A	3	não	não	NR	NR	não	não		
Albouy et al. 2011 ²⁶	Labrador (6) / 12	3	3	4 / 4	3	2,5	escovagem implantes + dentes / diária	NR	A	3 (40%-50%)	não	21-21 dias	3	ausência	não	não		
Schwarz et al. 2011 ⁴⁰²	Beagle (6) / 14-16	2,5	1,5	4 / 8	1,5	1,25	escovagem dentes + implantes / 2x/semana	m	A	4 (60%)	não	mensal	4	ausência	grupo 1: 1,8±1,2 grupo 2: 1,2±1,0 grupo 3: 2,1±1,6 grupo 4: 1,9±1,4	Cli (per-operatório-defeito intra-ósseo)		
Albouy et al. 2012 ²⁵⁷	Labrador (6) / 12	3	3	4 / 4	3	2,5	escovagem implantes + dentes / diária	NR	A	2,5 (40%)	não	21-21 dias	2,5	ausência	M: 3,00±0,44(OI-cOI)(Lig+) 0,03±0,5(OI-cOI)(Lig-) 3,23±0,77(mMPI-aEJ)(Lig+ Lig-) 4,69±0,98(mMPI-cOI) (Lig+ Lig-) TiUn: 3,27±0,45(OI-cOI) (Lig+) 1,47±0,65(OI-cOI)(Lig-) 5,06±1,56(mMPI-aEJ)(Lig+ Lig-) 6,04±1,74(mMPI-cOI) (Lig+ Lig-)	Rx Htm		

Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão (continuação)

Autor/Año	Raça (n.º) / Idade (m)	Medidas pré-colocação implantes		Implantes		Controlo Placa Bacteriana (pós colocação implantes e pré-ligadura)			Período com ligadura				Controlo Placa Bacteriana (per-ligadura)		Defeito peri-implantite	
		Dentes extraídos	Cicatrização (m)	N.º por hemimandíbula/total por animal	Cicatrização (m)	Duração (m)	Método / periodicidade	Dieta	Material	Duração (m) / Perda Óssea (%)	Acumulação extra de ligadura	Substituição ligadura	Período sem ligadura (m)	Duração (m)	Método	Tamanho Defeito ($\bar{x} \pm DP$) (mm)
Golubovic et al. 2012 ²²⁸	Beagle (6) / NR	¹ PM ₁ - ¹ PM ₁ ¹ + ¹ PM ₁ - ² PM ₂ ¹ PM ₁ - ¹ PM ₁ + ¹ PM ₁ - ² PM ₂	2,5	4 / 8	1,5	NR	NR	mole	A	4 (60%)	não	1	NR	NR	Cl: 2.59±1.93 (Htm) Cl2: 1.1±1.93 (CB)	CB Htm
Lopez-Piriz et al. 2012 ²²⁹	Beagle (5) / 12	¹ PM ₁ - ¹ PM ₁ + ¹ PM ₁	3	3 / 6	2	1	escovagem implantes + dentes / 1x dia / 5 dias por semana	mole	A	3	não	0,25	3	ausência	TST: 0,90±0,50 CTR: 1,92±0,77	RX
Carcuac et al. 2013 ²³⁵	Labrador (6) / 16	¹ PM ₁ - ¹ PM ₃ ¹ PM ₁ - ¹ PM ₁ + ¹ PM ₁	3	4 / 4	3,5	3	escovagem implantes + dentes / 3x/semana	NR	A	2,5	não	6,5**	2,5	ausência	M: 2,69±0,57 (Lig+)(RX) -0,02±0,06 (Lig-)(RX) 3,59±0,70 (mPM ₁ -aEj)(Htm) TIU: 3,14±0,69 (Lig+)(RX) -1,34±1,19 (Lig-)(RX) 5,01±1,59 (mPM ₁ -aEj)(Htm)	RX Htm
Levin et al. 2013 ²⁴⁸	Mongrel (2) / NR	¹ PM ₁ - ¹ PM ₁	3	2 / 4	1,5	NR	NR	NR	S + Ciano- acrilato	1,5	não	não	NR	NR	não	não
Madi et al. 2013 ²³¹	Beagle (6) / 22-24m	¹ PM ₁ - ¹ PM ₁	3	4 / 8	3	3	colut 0,12% chx / 3x/semana	mole	S	4	não	5**	4	ausência	M: 2,95±0,95 (Lig+)(PS) 1±0,6 (mLig-)(RX) 0,9±0,6 (dlLig-)(RX) SA: 3,0±0,8 (Lig+)(PS) 1,1±0,7 (mLig-)(RX) 0,97±0,6 (dlLig-)(RX) PHA: 2,93±0,85 (Lig+)(PS) 1,1±0,5 (mLig-)(RX) 0,83±0,5 (dlLig-)(RX) P: 3,7±1,45 (Lig+)(PS) 1,7±0,6 (mLig-)(RX) 1,6±0,6 (dlLig-)(RX)	Cl RX
Xin Fan et al. 2013 ²³⁰	Beagle (15) / NR	² PM ₂ - ³ PM ₃	0	NR / 4	4,5	4	escovagem implantes + dentes / diária	NR	A infiltrada com Pg	1,5	não	não	1,5	ausência	grupo A: 3,44±0,35 grupo B: 4,69±0,49 grupo C: 5,29±0,44	Cl (PS / 6 semanas)

Abreviaturas: **: valores dados por face mesial e distal não permitindo caracterizar o defeito; ##: sem controlo supragengival da placa bacteriana; *: medição clínica realizada na face vestibular; #: com controlo supragengival da placa bacteriana; AE: superfície com ataque ácido; aEj: zona apical do epitélio junctional; CB: Cone Beam Computed Tomography; chx: digluconato de clorhexidina; Cl: componente intra-ósseo; Cl: clínico; CNS: tratamento e cicatrização com implantes não-submersos; CO: crista óssea; cpTi: superfície de titânio comercialmente puro; CSTi: Cancelous Structured Titanium; CTR: Controlo; ERL: laser Er:YAG; HA: superfície de hidroxiapatite; HMDIr: hemimandíbula direita; HMEsq: hemimandíbula esquerda; Htm: histomorfometria; IBAD: deposição assistida por feixe iónico; imp: implante; Lig+: período com e sem ligadura; Lig-: período com o osso; OS: tratamento e cicatrização dos implantes submersos; PCM: margem mucosa peri-implantar; mPOM: média da perda óssea marginal; OI-cOI: distância histológica desde o ombro do implante até ao contacto mais coronal do implante com o osso; OI: distância histológica desde o ombro do implante até ao contacto mais coronal do implante com o osso; OS: tratamento e cicatrização dos implantes submersos; PCM: margem mucosa peri-implantar; Ul: grupo sem carga e com ligadura; PHA: superfície jateada com plasma de hidroxiapatite; PLC: perda de inserção clínica; PS: profundidade de sondagem; SA: superfície jateada/ataque ácido; SLA: superfície jateada com partículas grossas e com ataque ácido; TIA: Ti₆Al₄V; TiObi: superfície TiOblast®; TIU: superfície TiUblast®; TPS: superfície jateada com plasma de titânio; TST-Teste; VUS: aparelho de ultrassons.

I.5 – Avaliação crítica dos artigos incluídos

Das três raças de cães encontradas nesta revisão a Beagle foi a mais frequente (28 dos 56 artigos)^{126, 184, 185, 207-231}. A segunda mais frequente foi a “Mongrel” (17 dos 56 artigos)^{232-242, 243-248} e finalmente a Labrador (11 dos 56 artigos)^{186, 249-258} (Tabela 2.2).

O grupo de dentes posteriores mandibulares extraídos foi bastante heterogéneo, tendo variado desde a extração de apenas terceiro e quarto pré-molares bilaterais (${}_3\text{PM}_3\text{-}_4\text{PM}_4$)¹⁸⁵ até à extração da totalidade dos pré-molares (${}_1\text{PM}_1\text{-}_4\text{PM}_4$) e 1° e 2° molares (${}_1\text{M}_1\text{-}_2\text{M}_2$)²²⁷. Alguns autores também extraíram os pré-molares (${}_1\text{PM}^1\text{-}_4\text{PM}^4$) e molares (${}_1\text{M}^1\text{-}_2\text{M}^2$)^{227, 228} ou apenas pré-molares maxilares^{245, 254, 256-258} de forma a evitar o trauma sobre os implantes antagonistas, uma vez que todos os autores colocaram implantes na mandíbula (Tabela 2.2).

A posição ocupada pelos implantes na mandíbula pode estar relacionada com o grau de inflamação e subsequentes alterações no tecido ósseo¹⁷⁹. De facto, de acordo com um estudo de Lindhe *et al.*¹⁸² sobre periodontite experimental, a placa bacteriana acumula-se inicialmente na zona de contacto entre o 4° pré-molar e o 1° molar mandibulares, provocando aqui as primeiras alterações significativas nos parâmetros clínicos periodontais. Apenas mais tarde, se verificou a acumulação de placa bacteriana noutros locais. De acordo com esta predisposição para acumulação de PB, implantes localizados na zona do quarto pré-molar e 1° molar mandibulares estarão mais propícios à acumulação de PB do que os colocados noutro local. Ainda relativamente à localização dos implantes, a maioria dos autores refere apenas a localização dos dentes que extrai não referindo concretamente a posição ocupada pelos implantes. Esta posição, tendo em conta o previamente exposto, parece ser importante se se pretender maximizar a quantidade de PB em relação com o implante. Da mesma forma, a distância dente-implante e/ou implante-implante, com excepção de alguns estudos^{227, 228} não é mencionada. Considerando a etiologia bacteriana da peri-implantite³ no modelo canídeo, a distância entre o dente e o implante pode ser importante na medida em que a colonização do sulco peri-implantar está relacionada com a presença de bactérias específicas da peri-implantite no sulco gengival dos dentes adjacentes, mais do que nos dentes antagonistas ou contra-laterais²⁵⁹. Desta forma, a colocação de um implante adjacente a um dente deverá potenciar a colonização do sulco peri-implantar. Da mesma forma é importante manter uma adequada distância entre implantes adjacentes para evitar o contacto entre defeitos peri-implantares adjacentes e consequente perda da sua individualidade morfológica¹⁸⁵.

Tal como a zona de colocação dos implantes, também o seu período de cicatrização variou consideravelmente entre os estudos em análise, tendo oscilado entre os 1,5^{227, 248} e os 9 meses²⁵². Também o período de controlo de placa bacteriana após colocação dos implantes variou entre os 1,25²²⁷ e os 5 meses²⁵². Relativamente ao período de cicatrização dos implantes, e de acordo com os estudos incluídos nesta revisão, verifica-se que estudos mais recentes apresentaram períodos de cicatrização mais reduzidos de 2 ou mesmo 1,5 meses^{227, 229, 248}. Uma das possíveis justificações para tal, relaciona-se com o aperfeiçoamento de protocolos cirúrgicos e o desenvolvimento de superfícies de implantes que possibilitam um menor período de cicatrização. No entanto há autores que nem sequer fazem referência a este parâmetro, isto é ao período de cicatrização pós-colocação dos implantes. De facto, e de acordo com a análise dos diferentes estudos incluídos nesta revisão, verifica-se que vários autores não mencionam múltiplos aspetos do modelo experimental. Assim, outra particularidade notória da presente análise dos diversos estudos é a heterogeneidade no modelo experimental, a qual vem corroborar os resultados de uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Faggion *et al.*²⁶⁰. Grande parte dos estudos incluídos têm como objectivo primário o tratamento da lesão peri-implantar e não a análise da lesão propriamente dita. Uma outra revisão sistemática recente sobre a qualidade do relato de investigação experimental em implantologia refere a falta de desenhos padronizados neste tipo de investigação bem como limitações na descrição da metodologia²⁶¹. Da análise da Tabela 2.2 verifica-se a presença de uma

heterogeneidade em questões como o tempo de indução do defeito peri-implantar com recurso a ligadura ou o período de progressão da lesão peri-implantar sem recurso a ligadura, corroborando assim ambas as revisões supramencionadas.

De facto, os estudos experimentais devem ser cuidadosamente desenhados de modo a permitir uma validação ou certificação dos resultados. Por este motivo, alguns autores²⁶² criaram as *guidelines* “ARRIVE” (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) que pretendem funcionar como uma *checklist* na preparação ou na revisão de manuscritos sobre investigação animal.

Todos os estudos incluídos na presente revisão utilizam a ligadura como forma de indução do defeito peri-implantar, tendo a generalidade dos mesmos mencionado a ação concomitante da acumulação de PB, e da dieta mole. Assim, no que concerne à patologia peri-implantar, esta foi artificialmente induzida em modelos animais, diferindo do que ocorre de forma natural nos humanos. De facto, Schwarz *et al.*²²³ mencionam que as lesões peri-implantares induzidas por ligaduras em cães aparentam reproduzir as mesmas lesões de ocorrência natural em humanos, pelo menos no que respeita à configuração do defeito peri-implantar. No entanto, analisando os dados do estudo, verifica-se que a lesão mais prevalente nos cães (CI Ie) constituiu 86.6% dos defeitos, seguida da CI Ic e da CI Ia (6,7%, cada uma delas). Nos humanos, o defeito mais prevalente (CI Ie) constituiu apenas 55,3% dos defeitos, enquanto que os defeitos de CI Ib (15,8%), de CI Ic (13,3%), de CI Id (10,2%) e de CI Ia (5,4%) são os menos prevalentes. Deste modo, constata-se que o segundo defeito mais prevalente no humano (CI Ib) nem sequer tem qualquer expressão no modelo canídeo de peri-implantite induzida por ligadura. Da mesma forma, os quatro defeitos menos prevalentes no humano (CI Ib, CI Ic, CI Id e CI Ia) constituem cerca de 45% da prevalência de defeitos peri-implantares, enquanto que no modelo canídeo constituem cerca de 13%. Ora o objectivo dos modelos experimentais é mimetizar a patologia humana e neste caso tal mimetismo, pelo menos no que concerne à prevalência da morfologia do defeito peri-implantar, parece ser discutível. Por outro lado, este estudo apenas incluiu 24 pacientes o que certamente não será representativo da população. De facto, apesar do estudo de Schwarz *et al.*²²³ não ser um estudo sobre prevalência da peri-implantite, as *guidelines* emanadas do 6th EWP relativas a estudos de prevalência aconselham uma população entre 100-500 pacientes, de preferência de clínicas privadas¹⁵, o que também não aconteceu neste estudo. Por fim parece ser importante referir que este é o único estudo desenhado especificamente para comparar a morfologia de defeitos peri-implantares com os decorrentes do modelo canídeo com recurso a ligadura, o que poderá não ser suficiente para estabelecer uma adequada comparação entre ambos. São necessários mais estudos prospectivos, bem desenhados, com implantes em função há mais de 5 anos, para caracterizar adequadamente a morfologia do defeito peri-implantar no humano.

Relativamente à composição das ligaduras, verifica-se a existência de alguma heterogeneidade no material utilizado, variando entre a seda^{126, 209, 214}, o algodão^{234, 244, 257}, o poliéster com aço inoxidável²²⁰, o fio de arame com gaze²⁴⁶, a seda com cianoalcrilato²⁴⁸ ou mesmo um algodão infiltrado com *Porphyromona gingivalis* (Pg)²³⁰. De acordo com Shibli *et al.*²⁴¹, esta heterogeneidade no material a partir do qual a ligadura é feita pode estar na base dos diferentes resultados microbiológicos entre os estudos. As diferenças relativamente ao material utilizado no fabrico das ligaduras também podem explicar as diferenças nos resultados relativos à quantidade de reosteointegração, pois aquele pode influenciar a adsorção de proteínas à superfície do implante, proliferação e deposição de tecido ósseo. Assim, e tal como já descrito, a heterogeneidade de metodologia neste tipo de modelo experimental canídeo, poderá influenciar o futuro tratamento regenerativo da lesão peri-implantar.

No que concerne à forma como as ligaduras são aplicadas no sulco peri-implantar também se constatou uma heterogeneidade entre estudos. Esta distinta forma de colocação das ligaduras pode estar na base dos diferentes períodos de tempo requeridos para se verificar a perda de integridade dos tecidos peri-implantares^{263, 264}.

Alguns estudos referem a colocação de uma ligadura forçando-a para uma posição apical^{186, 223, 227}. A colocação adicional de ligaduras no defeito peri-implantar, sobre a ligadura original, é realizada por alguns autores¹⁷⁹. A sua consequência será acelerar a perda do aparelho peri-implantar²⁴⁴. Há ainda autores que nos modelos experimentais de indução de peri-implantite suturam as ligaduras à mucosa peri-implantar²⁴⁰⁻²⁴³ estando esta sutura associada a um processo inflamatório específico que não mimetiza uma patologia peri-implantar humana. Esta ação traumática da ligadura provoca o estabelecimento de uma bolsa peri-implantar iatrogénica, a qual posteriormente permite a acumulação subgingival de placa bacteriana. Deste modo primeiro estabelece-se uma solução de continuidade no selamento providenciado pelos tecidos peri-implantares e só depois ocorre a colonização desta bolsa. De facto, de acordo com os resultados de Shibli *et al.*²⁴¹, o número de patógenos encontrados no sulco peri-implantar após a aplicação das ligaduras aumenta. Assim a placa bacteriana aparece após e como consequência da bolsa peri-implantar traumáticamente estabelecida. Esta origem traumática da peri-implantite não está de acordo com a origem bacteriana definida no relatório de consenso no 6th EWOP³. A ligadura, ao ser responsável pelo aparecimento traumático de bolsas peri-implantares, cuja progressão nalguns estudos leva à perda do implante, pode favorecer a alteração na carga microbiológica nesses locais²⁶⁴ estabelecendo, por exemplo, condições de anaerobiose que não se observam em bolsas menos profundas. De facto, num estudo clínico, Socransky *et al.*²⁶⁵ estabeleceram a correlação entre a presença de bactérias como a *Porphyromonas gingivalis* e a profundidade de sondagem. Consequentemente, a flora microbiana encontrada nestes modelos experimentais pode não corresponder à encontrada na peri-implantite clínica, o que já foi descrito num recente estudo microbiológico comparativo, canídeo e humano, de Dahlen *et al.*²⁶⁶. Assim a utilização das ligaduras pode limitar a utilização deste modelo em estudos relacionados com a flora microbiana peri-implantar.

Quando uma nova ligadura é colocada numa posição submarginal previamente inflamada, poderá produzir uma peri-implantite de origem traumática²⁴³ e induzir uma reação de corpo estranho diferente da da patogénese da peri-implantite²⁴⁴. Deste modo, a presença da ligadura no sulco peri-implantar é em tudo semelhante à presença de cimento no mesmo local, ambos originando uma infeção peri-implantar. Este cimento parece funcionar como um corpo estranho e origina uma infeção³⁵. Esta perda óssea com origem no cimento, que resulta da cimentação da coroa, não ocasiona um quadro de peri-implantite mas antes é uma das situações clínicas com a qual se faz o diagnóstico diferencial da peri-implantite.

A propósito do papel da ligadura na indução de peri-implantite, numa revisão da literatura realizada por Quirynen *et al.*²⁶⁴, os autores sublinharam o facto de, após a remoção da ligadura das bolsas peri-implantares profundas, ocorrer um processo de cicatrização distinto, apesar das espécies patogénicas permanecerem no local. Esta cicatrização é caracterizada pela separação do infiltrado celular presente na mucosa peri-implantar do osso alveolar através de uma densa cápsula de tecido conjuntivo¹⁸⁶. No entanto, esta separação não é consensual pois nos modelos experimentais desenvolvidos por alguns autores este infiltrado atingiu o tecido ósseo¹⁵⁶. Assim a simples remoção da ligadura, tal como ocorre após a remoção de um corpo estranho, converte uma lesão destrutiva ativa numa lesão inativa e não-agressiva²⁶⁴. Esta identificação entre a utilização de ligaduras para promover a reabsorção óssea peri-implantar e uma resposta de corpo estranho foi também recentemente afirmada por Albrektsson *et al.*¹. Estes autores acreditam que a presença da ligadura numa zona peri-implantar, com o intuito de promover a destruição daqueles tecidos, não mimetiza a etiologia nem a progressão da lesão peri-implantar humana, questionando a aplicabilidade destes modelos para estudos relacionados com esta patologia. Estes dados vêm corroborar a afirmação de Berglundh *et al.*²⁶⁷ segundo os quais a ruptura tecidular provocada pela ligadura é uma parte técnica de um procedimento experimental, não sendo o modelo com ligadura o ideal para estudar a progressão da patologia. O tipo de ligadura, a sua posição apico-coronal e a

frequência com que é substituída durante a formação de placa bacteriana determinará a taxa de ruptura dos tecidos^{238, 267}. Tendo em conta o referido, a presença da ligadura num modelo de indução de peri-implantite acarreta características que não mimetizam o estabelecimento e a progressão natural da lesão^{224, 258}, enquanto outros referem não a substituição mas a acumulação adicional de ligaduras sobre a original^{213, 240-244}. Da mesma forma, o período de tempo que a ligadura permaneceu no sulco peri-implantar variou desde 1 mês^{233, 236} até 6²¹⁰ e mesmo 12 meses²²⁵, resultando defeitos peri-implantares com dimensões clínicas bastante heterogêneas, variando entre $3,70 \pm 0,60 \text{mm}$ ²¹⁰ e $7,16 \pm 1,14 \text{mm}$ ²²⁵.

Outra diferença entre os vários estudos incluídos nesta análise do modelo experimental diz respeito à progressão da peri-implantite. Enquanto alguns estudos criam o defeito peri-implantar com recurso à ligadura, removem-na posteriormente e executam determinado procedimento terapêutico em avaliação²⁰⁸, outros criam o defeito, removem a ligadura, deixam o defeito progredir durante um período variável de tempo e só depois realizam o procedimento terapêutico²⁵². São assim estabelecidas duas fases distintas de progressão da lesão, uma com recurso a ligadura e outra sem. Qualquer uma delas é variável no tempo de progressão. Esta nítida distinção de dois períodos de evolução foi inicialmente descrita por Zitzmann *et al.*²⁵², os quais desenvolveram um modelo experimental canídeo para estudo da peri-implantite tendo colocado 2-3 implantes iguais em cada hemimandíbula. Após uma indução de peri-implantite com recurso a ligadura e acumulação de PB, durante 2 meses (“ligature breakdown”), perdeu-se cerca de 2.5-3mm de tecido ósseo peri-implantar. Passado este período de tempo foram removidas as ligaduras e a lesão progrediu espontaneamente, apenas com acumulação de PB, durante 12 meses (“spontaneous progression”). Durante este período, 16 dos 21 implantes colocados apresentaram uma variável perda óssea, tendo-se perdido 2 destes, e 5 não tiveram alteração do seu nível ósseo radiográfico. De acordo com os autores as razões para esta variação podem estar relacionadas com a posição ocupada pelos implantes e correspondente microbiologia associada, ou com a qualidade da resposta do hospedeiro à infeção²⁵².

Alguns estudos fazem referência à perda de implantes, quer durante o uso da ligadura^{212, 245}, quer durante a fase sem ligadura^{240, 252}. Assim, com esta metodologia de indução de peri-implantite, nalguns casos, não foi possível controlar a evolução rápida, aguda, da lesão peri-implantar da qual resultou a perda de alguns implantes. A progressão da lesão peri-implantar em qualquer uma destas fases, com e sem ligadura, foi distinta. Durante a fase de ligadura, alguns estudos referem que esta progressão foi semelhante em implantes com distintas superfícies^{215, 224, 254}. Todavia, durante o período sem ligadura a progressão foi diferente de acordo com as distintas superfícies implantares^{224, 254}. De facto, Berglundh *et al.*²²⁴ constataram que a área ocupada por PB neste período sem ligadura era superior na superfície moderadamente rugosa, quando comparada com a superfície polida, confirmando desta forma a influência da superfície na adesão bacteriana. Esta influência apenas se verificou na ausência da ligadura. Estes dados parecem indicar o contributo das distintas superfícies implantares para a adesão bacteriana.

Como referido anteriormente, ao contrário dos modelos experimentais com recurso exclusivo a ligadura, alguns grupos de investigação já desenvolveram modelos que apresentam uma progressão da lesão mais natural, posterior à utilização da ligadura, apelidado de “período crónico”²⁴⁴ ou “progressão espontânea”^{224, 252} com o intuito de mimetizarem a progressão natural humana. Mais recentemente estes modelos, com duas fases distintas, têm sido consideravelmente utilizados^{227, 254, 255, 257}. De acordo com os autores, a identificação e aceitação da existência destes dois períodos de forma individual faria com que a progressão sem recurso a ligadura se assemelhasse à patogénese humana. No entanto, não há um acordo geral no sentido de se considerarem estes dois períodos de forma independente. Recentemente, Pettersson & Mengel²⁵⁴ focaram a sua atenção nalguns aspetos de um destes estudos frisando que o período com recurso a ligadura não pode ser um “período

independente 'pre-experimental' ". Segundo estes autores, os períodos "active breakdown" e "spontaneous progression" não podem ser considerados de forma independente porque o período de ligadura resultou em diferentes níveis de perda óssea nos quatro tipos de implantes investigados e o ponto de partida para a "spontaneous progression" seria distinto para todos os grupos²⁶⁸.

Por fim, e de acordo com as premissas da medicina baseada na evidência, é pertinente fazer referência a uma revisão sistemática na área da medicina, relativa aos efeitos de vários tratamentos, comparando os resultados obtidos em ensaios clínicos humanos e em experimentação animal²⁶⁹. Os autores concluíram que havia diferença entre ambos tipos de estudos e que esta diferença se devia à falha dos modelos animais em mimetizar adequadamente a patologia clínica ou devido a viéses. Recomendaram que quando os modelos animais não representam o contexto clínico devem ser adaptados de forma a fazê-lo.

Já na área da medicina dentária, uma revisão sistemática e meta-análise²⁶⁰, comparou o efeito do tratamento da infecção peri-implantar entre os estudos animais e os estudos clínicos. Os autores concluíram que existe uma grande heterogeneidade entre ambos, em termos de desenho do estudo bem como no tipo de tratamentos. De acordo com os mesmos, a patogénese induzida nos modelos animais pode não ser semelhante à da patologia humana, ocorrida de forma natural.

Em 2012, após a realização do 8th *European Workshop on Periodontology* (8th EWOP), foi reconhecido que os modelos experimentais utilizados para avaliar as reações tecidulares em relação aos implantes podem não recriar completamente o ambiente anatómico, fisiológico, biomecânico/funcional ou patológico das condições clínicas encontradas nos humanos²⁷⁰.

O "modelo da ligadura" ("*ligature model*") pode não mimetizar o estabelecimento e/ou a progressão da peri-implantite humana, apesar de comparações entre lesões produzidas com aquele modelo e biópsias humanas exibem características semelhantes²⁶⁷. De facto, outros autores afirmam que pouco se sabe sobre o processo que inicia a destruição do tecido peri-implantar, havendo neste campo uma controvérsia entre investigadores²⁷¹. Recentemente, Mombelli & Decaillet²⁷² concluíram que a presença de microorganismos na peri-implantite não indica necessariamente que os mesmos são a sua causa, pois nos atuais modelos experimentais, a ligadura cria uma lesão e só depois se estabelece a microbiologia adaptada à mesma. Esta infecção microbiana não está na origem da lesão.

A presente análise vem corroborar a conclusão da revisão sistemática e meta-análise de Faggion *et al.*²⁶⁰, tornando-se assim evidente a diferença existente na etiopatogénese dos defeitos peri-implantares experimentais no cão e os naturais presentes no humano. O contributo das ligaduras para o desenvolvimento das lesões peri-implantares não corresponde ao encontrado na patologia clínica e do seu uso resultam defeitos peri-implantares agudos de dimensões distintas. Essas dimensões poderão interferir com a flora bacteriana encontrada no defeito. Os atuais modelos experimentais justificam o desenvolvimento de um trabalho conducente a novos modelos experimentais translacionais para a patologia humana.

Recentemente a comunidade científica que estuda a genética canídea tem obtido resultados satisfatórios na identificação do genoma canídeo. A identificação de genes específicos de algumas patologias permite não só melhorar a compreensão da patologia canídea como também tornar o cão um modelo para condições humanas análogas²⁷³. Deste modo, caso haja no futuro a identificação de algum(s) gene(s) com o desenvolvimento da peri-implantite, atribuindo-lhe uma causa genética, poderá ser possível obter um modelo animal geneticamente modificado de forma a simular fidedignamente esta patologia humana.

Relativamente a esta capacidade mimética torna-se importante compreender os estadios iniciais do desenvolvimento da peri-implantite. A inexistência de evidência científica sobre a intervenção mais eficaz para tratar a peri-implantite²⁷⁴, torna mais premente a compreensão da totalidade do processo a ela associada e, mais importante, reconhecer uma série de características associadas à sua iniciação.

1.6 – Conclusão

Um modelo experimental deve mimetizar a patologia humana o mais possível de modo a permitir o estudo dos mecanismos fisiológicos, biológicos, anatómicos e terapêuticos da peri-implantite. Tal torna-se ainda mais premente quando a presente literatura indica a não existência de evidência científica relativamente à intervenção mais eficaz para tratar a peri-implantite, pelo que a sua compreensão e conhecimento, em distintas etapas de evolução, se torna crucial.

O atual modelo experimental canídeo para estudo da peri-implantite, com recurso a ligadura, provoca a inflamação dos tecidos peri-implantares de forma traumática, o que não traduz a situação clínica mais comum.

Assim justifica-se plenamente pensar em reestruturar os modelos experimentais para estudo desta patologia.

Capítulo III. Estudio experimental



I – Objetivos

O presente estudo experimental pretende avaliar in vivo, utilizando um modelo animal canídeo modificado, a resposta dos tecidos peri-implantares à placa bacteriana, tendo por base uma análise clínica, radiográfica, microbiológica e histológica. Neste contexto foram definidos os seguintes objetivos:

a) Primário:

- Determinar se a ausência de controlo da placa bacteriana altera os parâmetros clínicos, radiográficos, microbiológicos e histológicos nos tecidos peri-implantares.

b) Secundários:

- Caracterizar a evolução dos parâmetros clínicos, radiográficos e microbiológicos ao longo do período experimental;
- Determinar possíveis associações entre os parâmetros clínicos, radiográficos ou histológicos.

Com base nos objetivos estabelecidos foram formuladas as seguintes hipóteses nulas:

- A ausência de controlo de placa bacteriana não induz diferenças clínicas, radiográficas, microbiológicas ou histológicas nos tecidos peri-implantares;
- Para cada grupo, não existem variações dos parâmetros clínicos, radiográficos e microbiológicos entre os diferentes períodos de avaliação experimental;
- Os parâmetros clínicos ou radiográficos não estão correlacionados com os achados histológicos.

2 – Materiais e métodos

2.1 – Modelo experimental

2.1.1 – Modelo animal

O presente modelo experimental utilizou o cão de raça Beagle. Este animal tem como país de origem a Grã-Bretanha, existindo registos da raça na literatura inglesa do século III. A sua altura varia entre os 33 e 41 centímetros na cernelha e pesam, em média, entre 9 e 17 Kg, sendo as fêmeas ligeiramente menores que os machos²⁷⁵.

A dentição do cão Beagle apresenta diferenças em relação à humana. A sua dentição definitiva, obtida a partir do 6º-7º mês de vida, apresenta um total de quarenta e dois dentes: doze incisivos, três por hemi-arcada; quatro caninos, um em cada hemi-arcada; dezasseis pré-molares, quatro por hemi-arcada; e dez molares, dois por hemi-arcada superior e três por hemi-arcada inferior²⁷⁶.

A mucosa oral canídea é classificada em mucosa especializada (dorso da língua), mucosa alvéolar não-queratinizada e mucosa mastigatória queratinizada. Esta inclui o palato duro e a gengiva, a qual se separa da mucosa alvéolar pela junção mucogengival. A gengiva encontra-se dividida em gengiva aderida e gengiva livre, a qual contorna o perímetro dentário e delimita o sulco gengival. O suporte periodontal profundo é constituído pelo ligamento periodontal o qual permite a ancoragem do dente ao osso alveolar²⁷⁷. Do ponto de vista histomorfológico há uma grande semelhança entre estes e os tecidos periodontais humanos.

Para o desenvolvimento deste trabalho experimental utilizou-se uma amostra de seis cães (*Canis familiaris*) de origem pura, machos, com $2,45 \pm 0,04$ anos de idade e que apresentavam, no início do procedimento experimental (semana: -36), um peso de $17,04 \pm 0,99$ Kg (tabela 3.1). Estes animais, nascidos e criados para fins de investigação, foram adquiridos a uma empresa devidamente certificada para a produção de animais para fins experimentais (Isoquimen®, S.L., Spain).

Tabela 3.1 – Identificação dos animais.

N.º do cão	Raça	Sexo	Peso Inicial (Kg)	Data Nascimento	ID
1	Beagle	♂	18.40	24.11.2007	938000000392359
2	Beagle	♂	16.20	24.11.2007	938000000399465
3	Beagle	♂	16.50	09.12.2007	938000000395183
4	Beagle	♂	16.65	09.12.2007	938000000366833
5	Beagle	♂	16.30	09.12.2007	938000000359938
6	Beagle	♂	18.20	10.12.2007	938000000385900

Abreviaturas: ♂ - masculino; Kg - kilogramas; ID - identificação do cão por número de chip.

2.1.1.1 – Manutenção e bem-estar animal

A recepção, observação manutenção e experimentação animal foi conduzida no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (U.T.A.D.), Vila Real, Portugal, sob supervisão do Investigador Coordenador Responsável pelo bem-estar animal, o Prof. Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas.

As condições de saúde dos animais foram avaliadas à sua chegada por membros qualificados do corpo veterinário do Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Após um exame clínico inicial foram mantidos num período de quarentena, com vigilância diária, durante um período de seis semanas.

Durante a execução de exames médicos realizados nesse período de quarentena foi diagnosticada a Doença de Addison a um cão (ID n° 93800000375677). Este animal foi recolhido pela empresa responsável pela sua produção e prontamente substituído por um outro da mesma raça, idade e sexo (ID n° 93800000392359).

Todos os animais foram mantidos em jaulas individualizadas, em condições normalizadas de luz e humidade relativa adequadamente identificadas relativamente ao projeto de investigação e ao número do animal. As condições dos animais foram controladas diariamente pela equipa veterinária, assegurando-se uma digna qualidade de vida, com liberdade de movimentos, acesso fácil a alimentação e água *ad libitum*. Os animais tiveram um período de adaptação às instalações de cerca de 3 meses, antes de qualquer intervenção.

Desde a sua chegada até à “Primeira fase cirúrgica”, que correspondeu às extrações dentárias, todos os animais foram alimentados com uma dieta seca de origem comercial, granulada, (Hill’s® Science Diet® Adult Advanced Fitness Lamb Meal & Rice Recipe; Hill’s® Science Diet® Adult Advanced Fitness Chicken Meal & Rice Recipe; Hill’s Pet Nutrition, USA) com concentrações de contaminantes controladas e analisadas pelo fabricante.

Durante o período de cicatrização de uma semana após as extrações os animais foram alimentados com o mesmo granulado mas amolecido com água. Ultrapassado este período de cicatrização, retomaram a dieta granulada não amolecida durante 7 semanas. Este último regime alimentar à base de uma alimentação granulada foi mantido até à décima sexta semana antes da colocação dos implantes (semana -16), tendo-se posteriormente retomado a dieta mole até à sua eutanásia.

O pedido de autorização para este trabalho experimental foi efetuado à Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal, pertencente à Direção Geral de Alimentação e Veterinária do Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento Territorial, tendo recebido o parecer favorável n° 024226/2010. Posteriormente foi solicitado à mesma entidade a alteração do nome do projeto, respeitando integralmente o protocolo experimental previamente definido. Foi dado parecer favorável com o n° 006359/2012. O presente protocolo respeitou as Portaria n° 1005/92, de 23 de Outubro de 1992, Portaria n° 466/95, de 17 de Maio de 1995 e Portaria n° 1131/97, de 7 de Novembro de 1997.

O presente projeto de investigação foi financiado pelo “Institut Straumann AG, Basel, Switzerland”, através da assinatura de um protocolo de colaboração ente o mesmo e a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Portugal).

2.1.1.2. – Cronograma experimental

O presente projeto de investigação desenvolveu-se cronologicamente ao longo de 53 semanas (Fig. 3.1), tendo-se iniciado em Fevereiro de 2010 e terminado em Março de 2011.

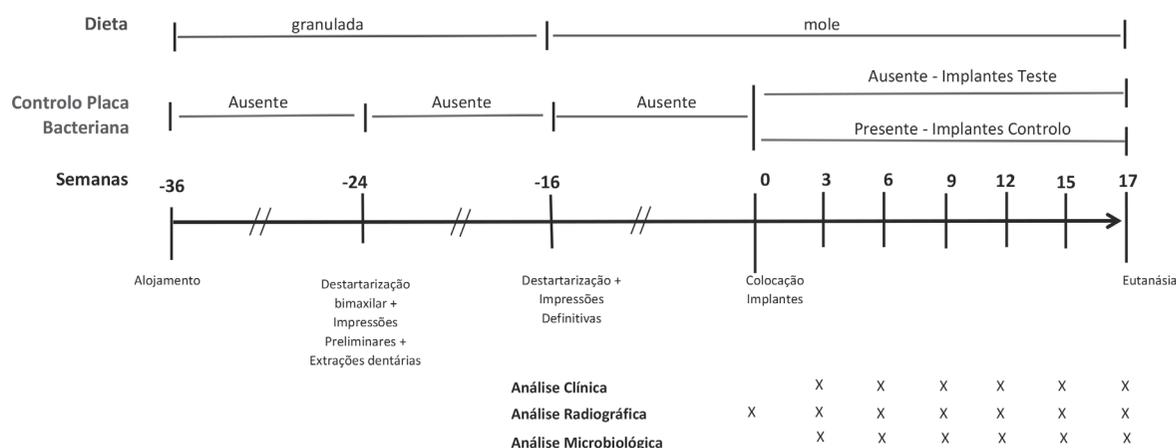


Figura 3.1 – Cronograma do procedimento experimental

2.1.2 – Cirurgia experimental

O procedimento cirúrgico deste projeto dividiu-se em duas fases:

- Primeira fase cirúrgica: corresponde ao período em que se fez a extração de todos os pré-molares e primeiro molar do 3° e 4° quadrantes ($1PM_{1-4}$; $1M_1$, respectivamente). Esta fase ocorreu 3 meses (12 semanas) após a recepção e alojamento dos animais.
- Segunda fase cirúrgica: correspondeu à colocação de dois implantes no 3° e 4° quadrante, na zona correspondente ao 4° pré-molar e ao 1° molar ($I-4PM_4$; $I-1M_1$, respectivamente). Esta fase ocorreu 9 meses (36 semanas) após a recepção e alojamento dos animais (6 meses após as extrações dentárias).

2.1.2.1 – Protocolo anestésico e extrações dentárias - Primeira fase cirúrgica

Antes de realizar a “Primeira fase cirúrgica” todos animais foram pesados e sujeitos a um exame clínico oral (anexo – tabela A).

A técnica cirúrgica foi igual em todos os animais, executando-se o mesmo procedimento anestésico e analgésico, nas mesmas condições de assepsia e realizada pela mesma equipa cirúrgica.

A cirurgia de extrações dentárias foi executada sob anestesia geral. Foi realizada uma pré-medicação com morfina 2% (0,3 mg/kg, B Braun Medical, Portugal) e dexmedetomidina (10 mg/kg) (Dexdomitor®, Esteve Farma, Portugal) ambos por administração intramuscular (I.M.), meia hora antes da indução. De seguida foi cateterizada a veia cefálica com um cateter (Introcan® -W 22G, B Braun Medical, Portugal). A indução anestésica foi realizada com diazepam (0,2 mg/kg)(Diazepam Labesfal, Portugal) e propofol *ad efectum*, (sensivelmente 2 mg/kg) (Propofol® Lipuro 2%, Braun Medical, Portugal), ambos administrados por via intravenosa (I.V.). A manutenção foi realizada com um sistema anestésico circular fechado com 1,5 a 2% de isoflurano (Isoflo®, Esteve Famam, Portugal) misturado em oxigénio a 100%, após entubação endotraqueal (tubo n° 6, In tube®, Intersurgical, Portugal).

Durante o decurso das intervenções foi realizada a monitorização contínua da frequência e ritmo cardíaco com eletrocardiograma (ECG), da pressão arterial média pelo método oscilométrico, da ventilação com capnografia e da saturação de oxigénio com oxímetro de pulso portátil. A temperatura corporal foi controlada de 30 em 30 minutos com termómetro digital (Fig. 3.2).

No pós-operatório foi administrado meloxicam (0,2 mg/Kg; I.M.) (Meloxidyl®, Ceva SantéAnimale, France).



Figura 3.2 – Cão sob anestesia geral e monitorizado.

Já com os animais anestesiados, e antes das extrações, foi realizada uma destartarização por ultra-sons (Ultima 1000, Henry Schein®, Melville, NY, USA), assim como um exame radiográfico digital aos dentes em causa

(Gendex Visualix® eHD, Gendex Dental Systems, IL, USA), de forma a avaliar a anatomia radicular e auxiliar a fase cirúrgica subsequente (Fig. 3.3).

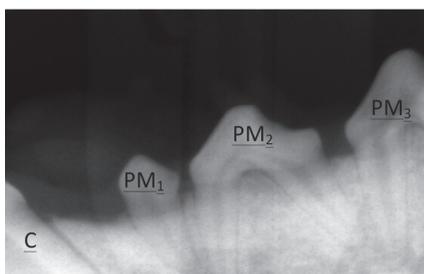


Figura 3.3 – Imagem radiográfica periapical lateral inferior
(C – canino; PM₁ – primeiro pré-molar; PM₂ - segundo pré-molar; PM₃ - terceiro pré-molar).

Após a realização da destararização foram realizadas impressões bimaxilares preliminares a cada animal, com silicone (Lab-Putty, Coltène®, Switzerland) em moldeiras universais n° 4 (Henry Schein® Portugal, Lisboa, Portugal).

De seguida procedeu-se à extração dos quatro pré-molares e primeiro molar mandibulares, tendo-se iniciado com a realização de uma incisão intra-sulcular com lâmina n° 15 montada em cabo de bisturi (Manuel Antão Lda®, Portugal) para elevação de um pequeno retalho mucoperiósteo com um descolador de Molt n° 9 (Manuel Antão Lda®, Portugal). Posteriormente, com uma broca diamantada cilíndrica (FG 879L, New Technology Instruments®, Germany) montada em turbina (Ultima 1000, Henry Schein®, USA) sob irrigação constante com soro fisiológico, procedeu-se à odontosecção corono-radicular e separação das raízes do segundo, terceiro e quarto pré-molares, bem como do primeiro molar.

Utilizando uma alavanca recta n° 2 (Manuel Antão Lda®, Portugal) realizou-se a luxação de todas as raízes, desde o primeiro pré-molar até ao 1° molar. As extrações dentárias foram finalizadas recorrendo a um boticão n° 150 (Manuel Antão Lda®, Portugal). De salientar a necessidade de extremo cuidado aquando das extrações devido ao facto das raízes se encontrarem anguladas e à qualidade compacta do osso mandibular.

Após a verificação da integridade de todas as raízes extraídas e para assegurar a ausência de remanescentes radiculares nos alvéolos, foram efetuadas radiografias apicais. De seguida, com recurso a uma broca esférica de carboneto de tungsténio (Referência 500 104 001 291 031, New Technology Instruments®, Germany) montada na peça-de-mão (Ultima 1000, Henry Schein®, USA), regularizou-se o rebordo da crista óssea sob irrigação constante. Após a curetagem de todos os alvéolos e irrigação abundante com soro fisiológico, os retalhos foram reposicionados no seu local inicial e suturados com pontos simples descontínuos com poliamida monofilamento 3-0 (Seralon®, Serag Wiessner, Germany).

Terminada a intervenção, os animais foram colocados em jaulas individualizadas, numa sala de recobro, sendo-lhes administrado meloxicam (0,2 mg/Kg; I.M.) (Meloxidyl®, Ceva Santé Animale, France). Cerca de 6 horas depois, foram colocados nas respetiva jaulas sempre sob vigilância da equipa veterinária, de forma a controlar a sua adequada recuperação e bem-estar.

Não foram verificadas quaisquer complicações pós-operatórias e a sutura foi removida uma semana após a cirurgia. Durante o período de cicatrização de uma semana todos os animais tiveram uma alimentação mole.

2.1.2.2 – Impressão para confecção das guias radiográfica e cirúrgica

Dois meses após as extrações realizaram-se as impressões definitivas mandibulares, seguindo o seguinte protocolo anestésico: realização de uma pré-medicação com dexmedetomidina (5 mg/kg; I.V.) (Dexdomitor®, Esteve Farma, Portugal) e midazolam (0,1 mg/kg; I.V.) (Midazolam®, Labesfal, Portugal). Na eventualidade de ser necessário obter maior profundidade anestésica recorreu-se à utilização de propofol (1 mg/kg; I.V.) (Propofol® Lipuro 2%, Braun Medical, Portugal). Este protocolo permitiu obter um tempo de anestesia que se revelou suficiente para o procedimento pretendido.

Recorrendo a moldeiras individuais previamente confeccionadas com base nas impressões preliminares realizadas durante a primeira fase cirúrgica, foram efetuadas as impressões definitivas mandibulares utilizando um silicone (Putty Lab, Coltene®, Altstätten, Switzerland) (Fig. 3.4).

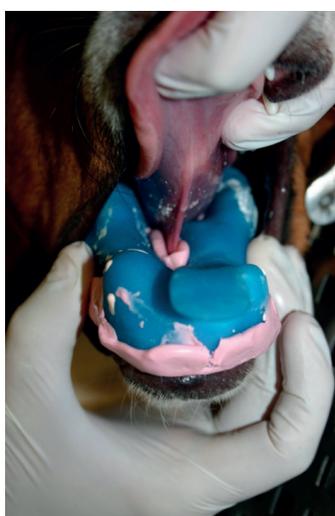


Figura 3.4 – Impressão definitiva mandibular com moldeira individual e silicone.

Terminada a impressão o animal foi levado para uma sala de recobro, acompanhado por um membro da equipa veterinária, e posteriormente para a respetiva jaula.

A partir das impressões de cada cão foram obtidos modelos em gesso, sobre os quais foram confeccionadas duas “Guias Cirúrgicas” em acrílico transparente (ProBase Cold Kit Clear®, Ivoclar/Vivadent; NY, USA), uma para a hemimandíbula esquerda (3º quadrante) e outra para a direita (4º quadrante). Cada guia incorporou dois anéis cirúrgicos de 5mm de diâmetro (referência 034.050V4; T-sleeve, Ø5mm, height 5mm; Institut Straumann AG, Basel, Switzerland) colocados com distâncias padronizadas: o centro do anel mais posterior a 10mm da face mesial do segundo molar; a distância entre o centro de ambos os anéis foi também de 10mm (Fig. 3.6). Deste modo garantiu-se a uniformização das distâncias entre o segundo molar mandibular (M_2 ; ${}_2M$) e o implante mais posterior (M_2 e I- M_1 ; ${}_2M$ e I- ${}_1M$), bem como entre ambos os implantes (I- M_1 e I- PM_4 ; I- ${}_1M$ e I- ${}_4PM$). Para além dos anéis, cada guia incorporava um orifício com o mesmo eixo que os anéis, a 35mm do seu extremo distal, que permitiu a colocação de uma sonda periodontal e marcar um ponto hemorrágico na gengiva assim como estabilizar o posicionamento da guia.

Da mesma forma, para cada cão, foi confeccionada uma guia radiográfica individualizada, em acrílico transparente (ProBase Cold Kit Clear®, Ivoclar/Vivadent; NY, USA). Nesta guia foram incorporados dois suportes universais, um para cada hemimandíbula, os quais permitiam acoplar, sempre na mesma posição, o sensor intra-oral retro-alveolar (RINN XCP-ORA®, Dentsply, IL, USA) (Fig. 3.17B).

2.1.2.3 – Implantes

Para este estudo experimental foram utilizados implantes endósseos Standard Plus® Ø3,3x8mm, *narrow neck* (SLA®, Institut Straumann AG, Switzerland) (Referência 042.930S; lote CE135). Sobre estes implantes foram utilizados pilares de cicatrização de titânio “Narrow Neck” (NN) com 3.4mm de altura, com parafuso oclusal (Institut Straumann AG, Switzerland) (Referência 048.043; lote AX589).

A superfície SLA® (*sand blasted – acid etched – large grit*) é produzida através de um jateamento com partículas de corindo (mineral à base de óxido de alumínio) com dimensões entre 250-500 µm, produzindo uma macro-rugosidade na superfície do implante. O jateamento é seguido por uma imersão, durante vários minutos, no banho de ácidos fortes (HCl/H₂SO₄), a elevada temperatura (superior a 100°C). Esta imersão remove as partículas remanescentes do jateamento e ataca a superfície de titânio produzindo microdepressões (“micropits”) na superfície de titânio com um diâmetro aproximado de 1-2µm^{278, 279}.

Esta superfície apresenta um ângulo de contacto dinâmico (molhabilidade) de 138,3°±4,2 o que caracteriza a sua superfície como sendo hidrofóbica, e uma superfície com uma concentração de oxigénio, titânio e carbono de 44,2±1,9%, 18,4±1,6% e 37,3±3,4%, respetivamente. A topografia apresenta uma rugosidade média (*Sa*) de 1,15±0,05µm²⁸⁰.

2.1.2.4 – Cirurgia de colocação dos implantes – Segunda fase cirúrgica

A colocação dos implantes realizou-se seis meses (24 semanas) após as extrações dentárias. A técnica cirúrgica foi igual em todos os animais, executada pelo mesmo operador e com a mesma equipa cirúrgica (Fig. 3.5). O protocolo anestésico foi igual ao efetuado na primeira fase cirúrgica tendo a cirurgia sido executada sob anestesia geral.



Figura 3.5 – Equipa cirúrgica durante procedimento operatório.

A cirurgia de colocação de implantes iniciou-se pela realização de uma incisão até ao tecido ósseo, ao longo da crista óssea edêntula da hemimandíbula direita (4º quadrante), com recurso a uma lâmina nº 15 montada num cabo de bisturi, maximizando a quantidade de gengiva aderente de ambos os lados da incisão. A incisão estendeu-se desde a face mesial do segundo molar até 35mm para mesial. Este limite foi previamente marcado após colocação da respectiva guia cirúrgica com um orifício criado para a passagem de uma sonda periodontal (PUNC 15, Hu-Friede®, USA), que permitiu criar um ponto hemorrágico gengival (Fig. 3.6).

Realizada a incisão foram cuidadosamente descolados dois retalhos mucoperiósteos, para além da linha mucogengival, com recurso a um descolador de Molt nº 9 (Manuel Antão Lda®, Portugal). Desta forma expôs-se a crista óssea para colocação dos implantes (Fig. 3.7). De acordo com o previsto a crista óssea encontrava-se perfeitamente cicatrizada realizando-se, apenas se necessário, uma ligeira regularização de eventuais irregulari-

dades. Todos os animais apresentaram uma largura das cristas ósseas no sentido vestibulo-lingual nunca inferior a 10 mm.

Seguiu-se o protocolo cirúrgico proposto pelo fabricante (Institute Straumann® AG, Switzerland) para a colocação de dois implantes endósseos em cada hemimandíbula. Como já foi anteriormente descrito, a uniformização da distância entre implantes e entre o segundo molar e o implante distal foi obtida utilizando uma guia cirúrgica encostada à face mesial do segundo molar e apoiada sobre a crista óssea.

A preparação dos leitos implantares foi iniciada pelo implante mais posterior (I_1M_1). Com o auxílio de um posicionador de broca cirúrgica (Drill handle, Straumann AG, Switzerland) (Referência 034.150) colocado sobre o anel mais posterior da guia cirúrgica, marcou-se a localização do implante utilizando uma broca esférica piloto de 1,4mm de diâmetro montada em contra-ângulo (20:1) acoplado a um motor para cirurgia de colocação de implantes (OsseoSet® 100, Nobel Biocare, Switzerland). De seguida utilizou-se a broca com 2,2mm de diâmetro (comprimento 33,0mm), de um conjunto de brocas descartáveis (Drill set, short, Straumann AG, Basel, Switzerland) (Referência 040.440S) (Fig. 3.8). A progressão da broca foi realizada a 650 rotações por minuto (r.p.m.) e sob irrigação constante com soro fisiológico. O leito foi preparado a uma profundidade de 8mm, correspondente à altura do implante a colocar, a qual foi confirmada com uma sonda periodontal (PUNC 15, Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA). Após o preparo inicial alargou-se o leito implantar utilizando a broca de 2,8mm de diâmetro, nunca excedendo as 600 r.p.m., sob constante irrigação. A direção de perfuração óssea foi cuidadosamente escolhida tendo em conta a guia cirúrgica e a anatomia mandibular. De seguida executou-se o mesmo protocolo para a preparação do leito implantar mais anterior, a nível do 4º pré-molar (I_4PM), mantendo uma broca de 2,8mm no leito implantar mais posterior (I_1M) assegurando a estabilização da guia cirúrgica e o paralelismo entre ambos os leitos implantares (Fig. 3.9).

Terminado o preparo de ambos os leitos implantares (Fig. 3.10), foi removido o implante do seu transportador fixando-o ao adaptador do contra-ângulo. Cada implante foi colocado no respetivo leito implantar, primeiro o mais posterior (I_1M), e de seguida o mais anterior (I_4PM), utilizando baixa rotação (15 r.p.m.) sem irrigação (Fig. 3.11a). A transição da superfície rugosa SLA para o colo polido do implante determinou o posicionamento do mesmo em relação a margem óssea (Fig. 3.11b).

Depois de colocados ambos os implantes (Fig. 3.12) a crista óssea foi irrigada com soro fisiológico proveniente do sistema de irrigação montado no motor utilizado para colocação dos implantes.

Eventuais ajustes da posição vertical do implante foram realizados manualmente com uma chave de torque (Institute Straumann® AG, Switzerland) (Referência 046.119).

Procedeu-se à colocação manual de pilares de cicatrização biselados com 3,4mm de altura (Institute Straumann AG, Switzerland) (Referência 048.043; lote AX589) tendo o cuidado de orientar o bisel para vestibular (Fig. 3.13).

Por fim, o retalho mucoperiósteo foi reposicionado no seu local original e suturado descontinuamente com um fio de poliamida 3-0 e agulha de 18mm *reverse cutting* (Seralon®, Serag Wiessner, Germany), utilizando pontos simples, ficando o pilar numa posição não-submersa. O número e a posição dos pontos de sutura foram constantes em todos os procedimentos cirúrgicos: dois pontos entre o segundo molar e o implante $1M$, outros dois entre ambos os implantes e um para mesial do implante $4PM$ (Fig. 3.14).

Este procedimento cirúrgico para colocação dos implantes foi repetido para o terceiro quadrante do mesmo animal.

Foram colocados no total 24 implantes: quatro implantes por cão, dois em cada quadrante inferior.

Uma semana após a cirurgia foram removidas as suturas.



Figura 3.6 – Guia cirúrgica colocada sobre mandíbula edêntula, apoiada na sua extremidade posterior na face mesial do segundo molar e segura manualmente na pega digital presente na extremidade anterior. Uma sonda periodontal colocada num orifício a 35 milímetros da face mesial do segundo molar marca um ponto hemorrágico sobre a gengiva.

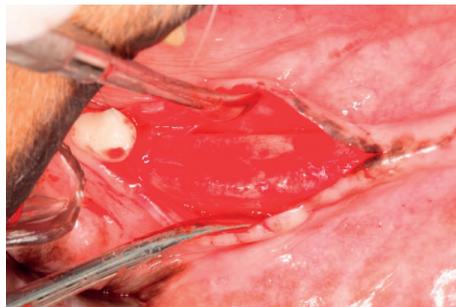


Figura 3.7 – Exposição da crista óssea edêntula após descolamento dos retalhos mucoperiosteos.

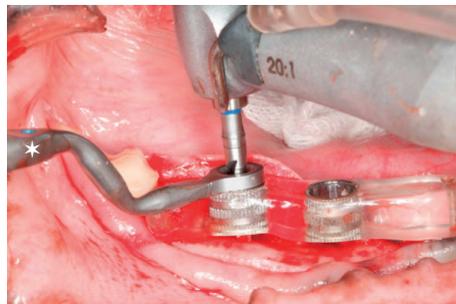


Figura 3.8 – Início da preparação do leito implantar com a broca cirúrgica de 2,2mm de diâmetro e o posicionador da broca cirúrgica (estrela).

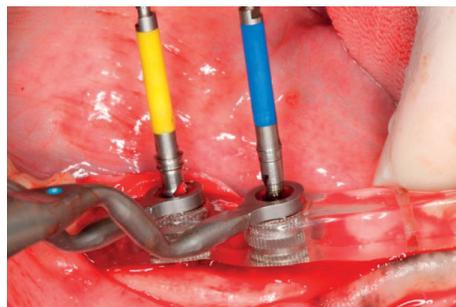


Figura 3.9 – Leitos implantares com brocas cirúrgicas de 2.8mm (amarela) e 2.2mm (azul).

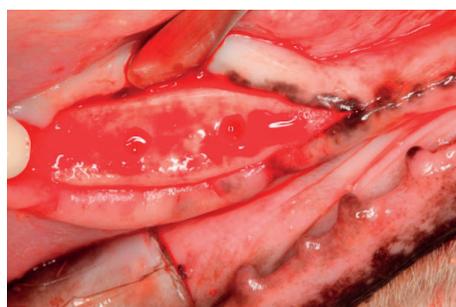
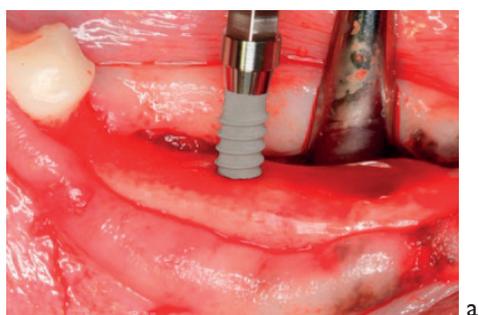
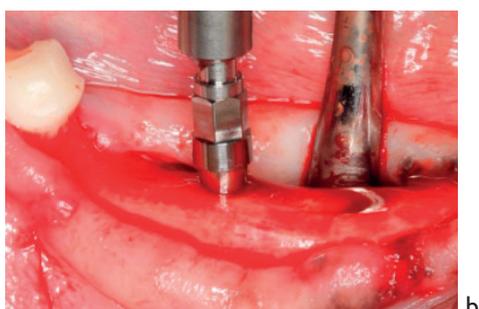


Figura 3.10 – Preparo final de ambos os leitos implantares.



a



b

Figura 3.11 – Colocação do implante I-M no leito implantar. a) inicial; b) final.

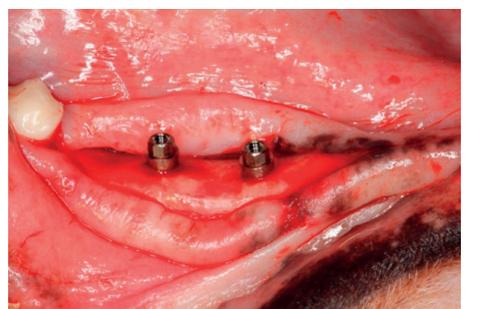


Figura 3.12 – Posição final de ambos os implantes.



Figura 3.13 – Pilares de cicatrização colocados sobre os implantes, com o bisel voltado para a face vestibular.

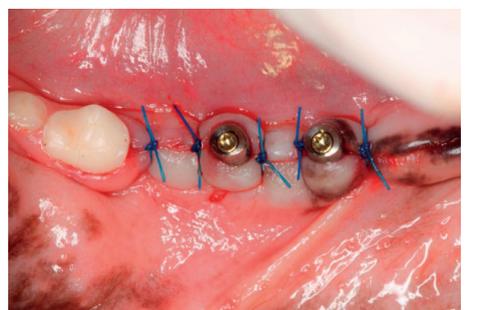


Figura 3.14 – Sutura com pontos simples utilizando um fio de poliamida.

2.1.2.5 – Aleatorização dos grupos experimentais: “implantes controlo” e “implantes teste”.

Em cada aleatorização foram utilizados quatro envelopes: dois envelopes identificados exteriormente como “Envelope 1” e indistinguíveis entre si, contendo no seu interior um a palavra “esquerda” e outro a palavra “direita”; os outros dois envelopes identificados exteriormente como “Envelope 2” indistinguíveis entre si, contendo no seu interior um a palavra “Teste” e outro a palavra “Controlo”.

Para cada animal, e após a colocação dos implantes em ambos os quadrantes, um membro da equipa que não assistiu à cirurgia procedeu à distribuição aleatória de cada hemimandíbula pelos dois grupos de estudo, implantes controlo (IC) e implantes teste (IT), sorteando um dos “Envelope 1” e um dos “Envelope 2”.

Deste modo, assegurou-se que cada animal contribuiu com uma hemimandíbula para o IC e a outra para o IT, num desenho experimental do tipo “boca dividida” (*split mouth*) (tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Resultado da aleatorização dos implantes pelos grupos controlo ou teste.

Nº do cão	ID	Hemimandíbula Esquerda	Hemimandíbula Direita
1	93800000392359	Controlo	Teste
2	93800000399465	Teste	Controlo
3	93800000395183	Teste	Controlo
4	93800000366833	Controlo	Teste
5	93800000359938	Teste	Controlo
6	93800000385900	Teste	Controlo

2.1.3 – Avaliação Pós-cirúrgica

2.1.3.1 – Protocolo para controlo da placa bacteriana

O controlo da placa bacteriana foi efetuado apenas no grupo IC. No grupo IT não foi realizado qualquer procedimento de higiene oral.

Antes de iniciar o protocolo de higiene oral efetuou-se a sua calendarização entre os três elementos responsáveis por tal. Desta forma, diariamente e durante 17 semanas, um único membro da equipa escovou o grupo IC de todos os cães, iniciando-se no dia após a colocação dos implantes. A escovagem foi efetuada sequencialmente em todos os cães e tentou-se manter constante o período do dia da sua realização.

Antes de iniciar o processo de escovagem do grupo IC, o membro da equipa responsável pela tarefa identificava o cão fazendo a leitura do marcador colocado na zona retroauricular esquerda. Recorrendo de seguida à tabela (tabela. 3.2) sabia qual das hemimandíbulas correspondia ao grupo IC, escovando-a de seguida.

Para efetuar a escovagem foram utilizadas seis escovas 20/100 (Elgydium®, Pierre Fabre, France), uma para cada animal, as quais foram previamente identificadas com os últimos 4 dígitos do número de identificação de cada cão. Entre as escovagens diárias, as escovas foram lavadas em água corrente, secas e guardadas em recipientes individuais. Sempre que as cerdas das escovas mostravam sinais de estar danificadas procedia-se à sua substituição. Esta substituição aconteceu para todos os animais, na oitava e na décima sexta semana.

Procedeu-se à preparação de uma solução aquosa de digluconato de clorhexidina 0,12% (Eludril®, Pierre Fabre, France), na concentração de 1:3 (clorhexidina:água), com água proveniente do sistema de abastecimento público. Previamente a cada escovagem, as escovas foram imersas durante 10 segundos num recipiente individual com esta solução.

O elemento responsável pela escovagem considerava os pilares do grupo IC escovados e limpos quando, visualmente, não detectava a presença de placa bacteriana ou de qualquer resíduo alimentar sobre a sua superfície. Se, previamente à escovagem, não era detectada placa bacteriana ou resíduos alimentares sobre os pilares do grupo IC, estes eram sempre escovados durante aproximadamente dez segundos.

O carácter dócil dos cães Beagle foi determinante na ausência de medidas de sedação para a escovagem.

2.1.3.2 – Avaliações periódicas

O protocolo anestésico adotado para a realização das avaliações periódicas foi igual ao realizado aquando da impressão definitiva mandibular (alínea 2.1.2.2).

Este protocolo permitiu manter o animal anestesiado o tempo suficiente para a avaliação clínica, radiográfica e colheita microbiológica. Terminada a avaliação o animal foi levado para uma sala de recobro, acompanhado por um membro da equipa veterinária, e posteriormente para a respetiva jaula.

Em todas as avaliações a equipa veterinária realizou um exame clínico detalhado dos animais, para determinar o seu estado de saúde geral, sendo registados os pesos e alguma observação julgada como não compatível com a sua saúde.

2.1.3.2.1 – Avaliação clínica

A avaliação clínica periódica teve início três semanas após a colocação dos implantes (S3). As avaliações subsequentes foram realizadas na semana seis (S6), nove (S9), doze (S12), quinze (S15) e dezassete (S17) (Fig. 3.15).

O exame clínico peri-implantar foi realizado sempre pelo mesmo operador e, quando aplicável, com recurso a uma sonda periodontal (PUNC 15, Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA).

Os parâmetros clínicos peri-implantares avaliados foram:

- *Presença de placa bacteriana (PPB)* – deteção visual de placa bacteriana na superfície do pilar de cicatrização adjacente à margem gengival^{281 cit in 282}. Os resultados foram registados de acordo com os seguintes critérios: ausente (código 0) ou presente (código 1) (Fig. 3.15). Este parâmetro foi avaliado nas quatro faces peri-implantares (mesial, distal, vestibular e lingual) e registado percentualmente consoante se apresentava numa face (25%), em duas (50%), em três (75%) ou nas quatro faces (100%). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão da percentagem de PPB para cada grupo (IC e IT).
- *Mucosite peri-implantar (MPI)* – deteção visual da presença nos tecidos moles peri-implantares de eritema e/ou edema. Os resultados foram registados de acordo com os seguintes critérios: ausente (código 0) ou presente (código 1) (Fig. 3.15). Este parâmetro foi avaliado nas quatro faces peri-implantares (mesial, distal, vestibular e lingual) e registado percentualmente consoante se apresentava numa face (25%), em duas (50%), em três (75%) ou nas quatro faces (100%). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão da percentagem de MPI para cada grupo (IC e IT).



Figura 3.15 – implantes teste com placa bacteriana sobre os pilares e inflamação nos tecidos moles peri-implantares representativa de mucosite.

- *Profundidade de sondagem (PS)* – medição em milímetros da distância da margem gengival peri-implantar à extremidade da sonda periodontal, localizada no limite apical do sulco peri-implantar. Este parâmetro foi avaliado em três faces peri-implantares (mesial, distal e lingual). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão de PS para cada grupo (IC e IT).
- *Hemorragia após sondagem (HS)* – presença de hemorragia nos trinta segundos subsequentes à sondagem periodontal²⁸². Os resultados foram registados de acordo com os seguintes critérios: ausente (código 0) ou presente (código 1). Este parâmetro foi avaliado em três faces peri-implantares (mesial, distal e lingual) e registado percentualmente consoante se apresentava numa face (33,3%), em duas (66,6%) ou em três faces (99,9%). A partir destes valores, foi calculada a média e desvio padrão da percentagem de HS para cada grupo (IC e IT).
- *Nível da margem gengival (NMG)* – distância, em milímetros, desde o topo coronal do pilar de cicatrização (cPC) à margem gengival (MG) (Fig. 3.15). Este parâmetro foi avaliado nas quatro faces peri-implantares (mesial, distal, vestibular e lingual). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão de NMG para cada grupo (IC e IT).
- *Nível de inserção clínico (NIC)* – determinado indiretamente através da soma da PS e do NMG. Este parâmetro foi avaliado em três faces peri-implantares (mesial, distal e lingual). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão de NIC para grupo IC e IT.
- *Supuração (Sup)* – detecção visual da presença de pus no sulco peri-implantar após a sondagem. Os resultados foram registados de acordo com os seguintes critérios: ausente (código 0) ou presente (código 1). Este parâmetro foi avaliado em três faces peri-implantares (mesial, distal e lingual) e registado percentualmente consoante se apresentava numa face (33,3%), em duas (66,6%) ou nas três faces (99,9%). A partir destes valores foi calculada a média e desvio padrão da percentagem de supuração para cada grupo (IC e IT).

A avaliação destes parâmetros clínicos foi realizada de forma sequencial e pré-definida, iniciando-se no implante $1M_1$ ($I-1M_1$) e passando para o $4PM_4$ ($I-4PM_4$). Em cada cão foi primeiro avaliado o grupo implantes controlo (IC) e depois o grupo implantes teste (IT). A avaliação em cada implante iniciou-se pela face distal, passando à mesial, à lingual e, quando aplicável, à vestibular. Foram utilizadas sondas periodontais distintas para cada grupo e para cada cão.

2.1.3.2.2 – Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica foi realizada segundo a técnica paralelométrica, com uma ampola de cone longo e sensor intra-oral digital colocado em posição retroalveolar. Todos os implantes foram avaliados imediatamente após a sua colocação (semana 0) bem como após 3, 6, 9, 12, 15 e 17 semanas.

Aquando da radiografia, o animal foi colocado em decúbito lateral, sobre o lado oposto ao quadrante a radiografar (Fig. 3.16).



Figura 3.16 – Controle radiográfico com recurso a guia radiográfica e sensor intra-oral retroalveolar.

Foi utilizado um sensor digital (Gendex® Visualix eHD, Gendex Dental System, USA) e respetivo programa de arquivo e processamento de imagem (VixWin Platinum®, Gendex Dental Systems, USA). Todas as radiografias foram feitas utilizando o mesmo aparelho de radiologia dentária (Trophy® Trex, France). As exposições foram feitas a 70 KV e 8 mA a uma distância do sensor aproximada de 10 centímetros e com um tempo de exposição de 0,12 segundos.

O controlo radiográfico foi feito com recurso à utilização de uma guia radiográfica individualizada, previamente confeccionada em acrílico transparente (ProBase Cold Kit Clear®, Ivoclar/Vivadent, USA) com base nos modelos de estudo executados para cada cão. Incorporados nesta guia estavam dois suportes universais, um para cada hemimandíbula, os quais permitiam acoplar sempre na mesma posição o porta sensor (RINN XCP-ORA®, Dentsply, USA) (Fig. 3.17a).

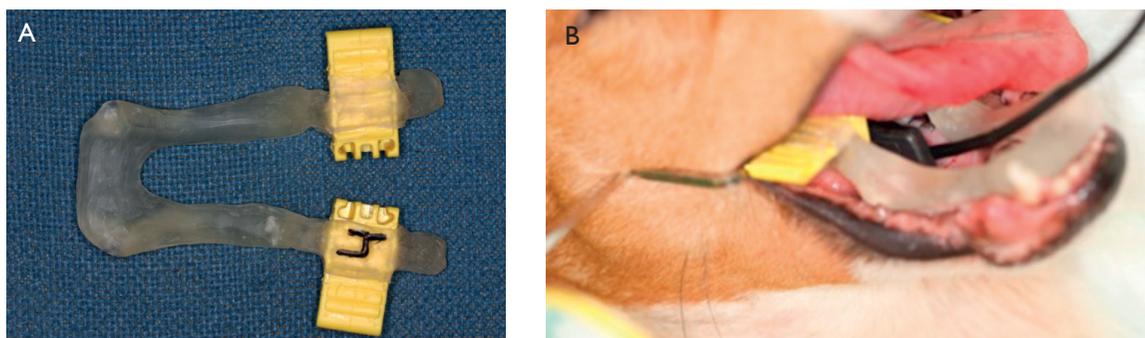


Figura 3.17 – Guia radiográfica (A); posicionamento intra-oral da guia com o sensor (B).

A distância e orientação da ampola do aparelho de raios-X relativamente aos implantes a radiografar foram determinadas com recurso à utilização de uma haste metálica (RINN XCP-ORA®, Dentsply, USA) (Fig. 3.16). Adicionalmente, foi registado o ângulo vertical e horizontal da ampola de modo a serem repetidos nas radiografias subsequentes. Desta forma pretendeu-se manter ao longo de todos os controlos radiográficos quer o mesmo ângulo quer a distância da ampola em relação aos implantes. Todas as imagens foram armazenadas para posterior análise.

2.1.3.2.3 – Avaliação microbiológica

A colheita microbiológica foi realizada nas semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 após a colocação dos implantes. A primeira colheita, realizada na S3, efetuou-se nos implantes colocados na posição do primeiro molar, tanto no terceiro (I-₁M) como no quarto (I-₁M₄) quadrante, correspondendo ao grupo IT ou IC consoante o animal e a aleatorização. A segunda colheita, realizada na S6, efetuou-se nos implantes colocados na posição do quarto pré-molar, tanto no terceiro (I-₄PM) como no quarto (I-₄PM₄) quadrante. Nas colheitas subsequentes foram-se alternando os locais de recolha entre I-₁M₁ ou I-₄PM₄, sendo a última colheita (S17) realizada nos implantes colocados na posição do quarto pré-molar, tanto no terceiro (I-₄PM) como no quarto (I-₄PM₄) quadrantes.

Previamente à colheita, a placa bacteriana supragengival foi removida da superfície do pilar correspondente com uma gaze esterilizada. O pilar foi então isolado de forma a eliminar qualquer contacto com a mucosa jugal, com a língua ou com saliva. Para a colheita da placa bacteriana infragengival foi cuidadosamente colocado no sulco peri-implantar um cone de papel esterilizado (#30, Dentsply Maillefer®, Switzerland) na face vestibular, onde permaneceu durante 30 segundos (Fig. 3.18).



Figura 3.18 – Cone de papel colocado no sulco peri-implantar da face vestibular do implante na posição do quarto pré-molar.

O mesmo procedimento foi repetido uma segunda vez no mesmo local, obtendo-se assim duas colheitas para cada implante e em cada período de avaliação.

2.1.4 – Eutanásia dos animais e recolha de amostras para histologia

Decorridas dezassete semanas desde a colocação dos implantes, procedeu-se à anestesia geral de cada animal, recorrendo ao mesmo protocolo anestésico igual ao realizado para as ambas as fases cirúrgicas. Foi efetuado um último exame clínico geral aos animais com registo do seu peso (anexo – tabela A).

Durante esta intervenção foram realizados os procedimentos para fixação *in vivo* dos tecidos mandibulares. Após a colocação do animal em decúbito dorsal procedeu-se à disseção dos tecidos até exposição de

ambas as carótidas primitivas. Depois de expostas foram passados dois fios em redor de cada vaso, com dois nós cada, distando cerca de 2 centímetros, colapsando momentaneamente os vasos e interrompendo assim a circulação sanguínea. De seguida, foi colocado um cateter em cada artéria e injetados simultaneamente em ambos os vasos sanguíneos 120 ml de formaldeído a 10% tamponado (PRS Panreac®, Spain), tendo sido libertados os nós, de modo a reinstalar a circulação sanguínea e perfundir o formol em direção cefálica. A perfusão dos tecidos intraorais foi verificada através do progressivo esbranquiçar das mucosas orais.

Esta manobra provocou uma paragem cardíaca, confirmada pelo anestesista da equipa veterinária através do registo do ECG e por auscultação. De modo a assegurar a eutanásia foi injetada uma “overdose” de Pentotal Sódico (I.V.) (Pentotal® sódico, Abbot®, Portugal).

Confirmada a eutanásia dos animais os tecidos superficiais foram dissecados de forma a permitirem a remoção das mandíbulas dos seis animais. Foram feitos cortes transversais na base de cada ramo ascendente, permitindo deste modo a remoção parcial da mandíbula. De seguida executaram-se secções transversais entre o segundo pré-molar e o segundo molar, separando o bloco contendo ambos implantes e tecidos adjacentes.

Terminada a secção, as amostras foram individualmente colocadas em recipientes identificados, preenchidos com uma solução tamponada de formol a 10%. Cada recipiente tinha a identificação do estudo, do cão, da hemimandíbula (esquerda ou direita), do local e data de eutanásia e a identificação da solução fixadora. Após selagem dos recipientes com Parafilm® (Brand GmbH, Wertheim, Germany) estes foram acondicionados numa mala térmica e transportados para o Laboratório de Tecidos Duros da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde foram guardados durante 48h a -4°C.

2.2 – Preparação das amostras

2.2.1 – Amostras para análise microbiológica

Após a colheita microbiológica os cones de papel foram colocados num tubo eppendorf de 1,5ml (Eppendorf Iberica®, S.L.U., Spain) esterilizado e identificado, o qual foi imediatamente armazenado a -20°C. Da identificação do tubo constou o número do cão, do implante, data da colheita e identificação do projeto.

Depois de devidamente acondicionadas, as amostras foram transportadas para o Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo como responsável a Prof.ª Doutora Teresa Gonçalves, onde ficaram armazenadas a -80°C.

Na análise microbiológica, para além do número total de bactérias presentes na amostra (Bactérias Totais) quantificou-se o DNA (μg (DNA)/ml de solução) das seguintes bactérias: Género *Streptococcus* (*Streptococcus spp*); Género *Fusobacterium* (*Fusobacterium spp*); *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*).

O protocolo iniciou-se pela extração do DNA das amostras do seguinte modo: depois de descongeladas as amostras foram colocadas num tubo eppendorf de 1,5ml com 150 μl de uma solução salina de fosfato (PBS, Sigma-Aldrich®, USA) e sujeitas a incubação a 30°C durante 10 minutos numa estufa (Heraeus®, Germany). Após esse período, foram agitados no vórtex durante 1 minuto. Os eppendorfs estabilizados foram colocados num suporte de esferovite, em água, a uma temperatura de 100°C durante 10 minutos numa placa de aquecimento (Jenway 1000, Sigma-Aldrich®, USA). Seguidamente, transferiu-se 150 μl de amostra para um eppendorf de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 600 μl de etanol absoluto (-20°C) (Merk®, Germany). Após este pe-

ríodo, trabalha-se apenas com a solução e não com os cones de papel. Após centrifugação durante 5 minutos a 13000 r.p.m. (Centrifuga 5415C, Eppendorf®, USA), rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 600 µl de Etanol a 70% (4°C). Voltou-se a centrifugar durante 5 minutos a 13000 r.p.m. e deixou-se secar o pellet à temperatura ambiente. Por fim, ressuspendeu-se em 80 µl de água estéril.

Realizada a extração do DNA, procedeu-se à sua quantificação com recurso à técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR).

As reações de RT-PCR foram realizadas no equipamento LightCycler 2.0 (Roche®, Mannheim, Germany) tendo sido utilizados *primers* específicos para as bactérias pesquisadas (anexo – tabela B).

As misturas das reações de amplificação eram compostas por 5 µl de DNA extraído, 4 µl da Master Mix do Kit comercial LightCycler® FastStart DNA Master Plus SYBR Green I (Roche®, Mannheim, Germany), 0,4 µM de cada *primer* excepto, para o par de *primers* das Bactérias Totais que foram usados 0,3 µM e para o par de *primers* de *Fusobacterium spp.* que foram usados 0,5 µM e água livre de RNA, de RNAses e de DNAses para perfazer o volume final de reação até 20 µl.

O sinal de fluorescência foi adquirido no final da extensão. A curva de *melting* foi obtida por monitorização contínua da fluorescência com variação da temperatura de 65°C até 95°C, a uma taxa de 0,2°C/segundo. As amostras foram consideradas positivas quando observado um único pico de *melting* entre as temperaturas (°C) correspondentes a cada bactéria (anexo – tabela C). Para validação da reação de amplificação e exclusão de possíveis contaminações, foram incluídos em cada ensaio um controlo positivo (DNA purificado da bactéria em estudo) e um controlo negativo (água livre de RNAses e de DNAses).

Na quantificação do DNA bacteriano, a análise foi realizada usando o Software LightCycler 4.1 (Roche®, Sistemas de Diagnóstico, Lda, Amadora, Portugal). Para cada bactéria foi gerada uma curva padrão com quantidades conhecidas de DNA, utilizando DNA de culturas puras de cada uma das bactérias estudadas. Para a quantificação das bactérias totais, a curva padrão foi feita com DNA de *P. gingivalis*.

O limite mínimo de DNA bacteriano detectável foi, em termos médios, na ordem de 10⁻⁵ µg (DNA)/ml.

2.2.2 – Amostras para análise histológica

O material utilizado nos estudos histológicos foi processado no Laboratório de Tecidos Duros da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo como responsável o Prof. Doutor Fernando Guerra. Para a obtenção de cortes histológicos não desmineralizados foi utilizada a técnica desenvolvida por Karl Donath²⁸³, em 1982, baseada no sistema de alta precisão Exakt® (Exakt® - Apparatebau, GmbH&CO, Norderstedt, Hamburgo, Germany). Esta técnica não descalcificada desenvolve-se ao longo das seguintes etapas:

- a) Fixação: as amostras foram fixadas através da imersão numa solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato (PRS Panreac®, Spain), durante 48h, com um pH 7,4. Após este período as amostras foram lavadas com água corrente, durante cerca de 5 minutos.
- b) Desidratação/infiltração: numa primeira fase procedeu-se à desidratação com cinco séries crescentes de álcool etílico (solução de álcool/água: 60%, 80%, 96%, 100% e 100%). As amostras foram deixadas em agitação constante na correspondente unidade Exakt® durante 21 dias em cada uma das concentrações indicadas.

Numa segunda fase, as amostras foram deixadas numa solução de álcool /resina metacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer&Co, Germany) com três séries crescentes (70/30; 50/50; 30/70) e duas séries com Technovit

7200 VLC a 100%. Durante ambas as fases as amostras foram sujeitas a uma agitação contínua (Jkika Labortechnik HS 501 digital®, Exakt, Germany) (Fig. 3.19).



Figura 3.19 – Dispositivo de agitação para desidratação e infiltração do sistema Exakt®.

c) Inclusão / fotopolimerização: as amostras foram colocadas em moldes específicos de inclusão, com uma resina (Technovit® 7200 VLC, Kulzer&Co, Germany). A polimerização foi efetuada numa unidade de fotopolimerização (Exakt® 520 Light Polymerization Unit, Germany) (Figura 3.20 A e B), inicialmente com luz amarela durante um período de 2 a 4h, a uma temperatura inferior a 40°C. Num segundo passo o ciclo de luz azul completou a polimerização da resina que se encontrava ao nível interno dos tecidos, durante 12h e a uma temperatura de 50°C. Terminada a polimerização dos blocos de resina estes foram removidos dos recipientes de inclusão e colocados em estufa por um período de 48h.

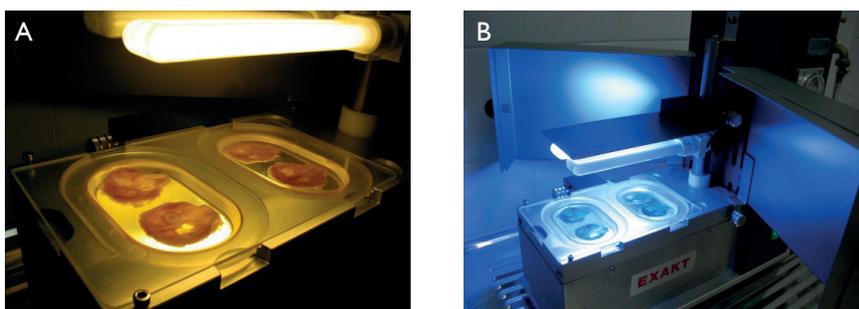


Figura 3.20 – Unidade de fotopolimerização com ciclo de luz amarelo (A) e azul (B).

d) Cortes iniciais dos blocos: as amostras foram colocadas na garra da unidade de corte (Exakt® 300 CP Precision Parallel Control, Germany) e orientadas para que os cortes sejam paralelos entre si e ao longo eixo dos implantes (Fig. 3.21 A e B).

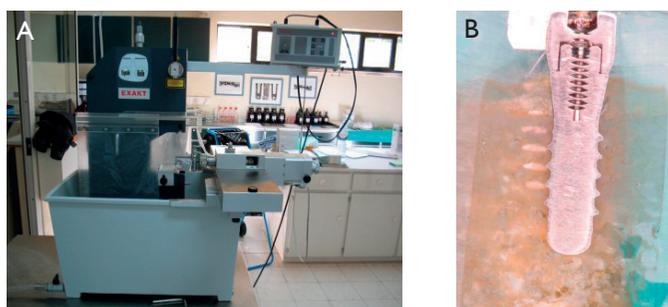


Figura 3.21 – Unidade de corte do sistema Exakt® (A). Implante incluído em metacrilato após o primeiro corte (B).

De seguida com a serra diamantada (Exakt grinding equipment, Exakt®, Germany) efetuaram-se os cortes necessários para reduzir as amostras incluídas no metacrilato a espessuras aceitáveis, orientadas de modo a permitirem a colagem e polimento subsequentes de forma paralela ao longo eixo dos implantes. Os cortes foram realizados de modo a obter uma amostra removida da parte central do implante no sentido mesio-distal. A partir da estrutura remanescente, vestibular e lingual, obtiveram-se mais dois cortes, um em cada uma das estruturas, no sentido vestibulo-lingual.

- e) Preparação da “sanduíche”: cada amostra foi colada no primeiro slide (slide A) (50x100x1,5mm) usando a cola apropriada (Technovit® 4000, Kulzer & Co., Germany) e de seguida colocada na prensa da unidade de colagem (Exakt®, Hamburg, Germany) onde permaneceu apertada durante 5 minutos.
- f) “Facing” da amostra (desgaste e polimento): procedeu-se ao desgaste e polimento da superfície da amostra até se atingir a estrutura que se pretende estudar, utilizando a unidade de polimento do sistema Exakt (Micro Grinding System Exakt® 400 CS) e lixas de granulometria decrescente (de 1200 grit até 4000 grit).
- g) Montagem do slide final: antes da colagem do slide final (slide B) (25x75x1,5mm) a amostra foi limpa com água corrente e seca em papel absorvente. As superfícies polidas da amostra e o slide B foram limpos com um solvente orgânico (benzina).

De seguida o slide B foi colocado na prensa de colagem com vácuo, pincelaram-se as superfícies com resina (Technovit® 7230 VLC, Kulzer & Co., Germany) e fechou-se a prensa durante 15 minutos. Verificando-se uma correta adaptação entre as superfícies inicia-se a fotopolimerização com lâmpada de luz visível durante 15 minutos.

Antes do corte final da sanduíche mede-se a sua espessura total e determina-se a espessura da cola, após calibrar o micrómetro digital (Mitutoyo® 2093, Digimatic Micrometer, Japan) (Fig. 3.22).

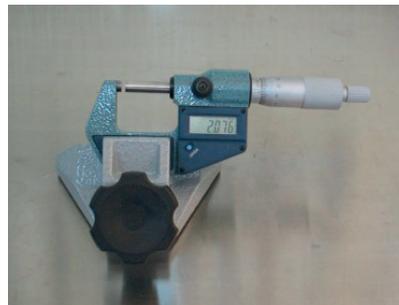


Figura 3.22 – Micrómetro digital para medição de espessura.

Após separação da sanduíche, ou seja, os dois slides (grande e pequeno) iniciou-se o polimento final do slide pequeno que será corado (Fig. 3.23).

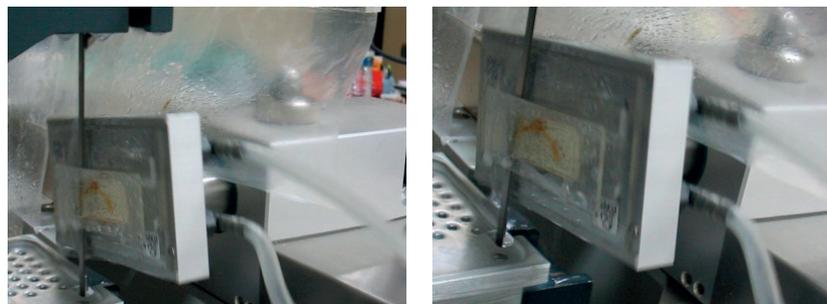


Figura 3.23 – Separação do slide final na unidade de corte.

- h) Preparação final do corte histológico: o slide com a amostra (lâmina) foi colocado na unidade de polimento e seguindo a granulometria indicada no protocolo (1000, 1200, 2500 e 4000) fizeram-se desgastes consecutivos até atingir a espessura pretendida (100 µm) para posterior observação ao microscópio.
- i) Coloração: agitou-se o slide com o corte durante 5 minutos numa solução de água oxigenada a 9%. De seguida passou-se por água corrente e secou-se com papel absorvente. A amostra foi corada com Azul de Toluidina (Merck®, Germany) durante 20 minutos, novamente lavada e seca, ficando pronta a observar em microscópio ótico.
- j) Identificação: as lâminas foram devidamente identificadas através de uma nomenclatura que continha a identificação do cão, a posição do implante, a direção do corte, a coloração utilizada e o investigador responsável pelo projeto.

2.3 – Métodos de análise

2.3.1 – Análise radiográfica

A análise das imagens radiográficas foi efetuada com o programa de processamento de imagem (VixWin Platinum®, Gendex Dental Systems, USA). Um único avaliador, cego em relação aos grupos em análise, realizou por duas vezes cada medição, com um mês de intervalo.

Não havendo discrepância significativa entre ambas medições utilizou-se aquela realizada em primeiro lugar. Considerou-se como limite discrepante o valor de 0,18mm²⁸⁴. Se se verificasse alguma discrepância entre ambas era realizada nova medição.

Todas as imagens foram avaliadas no mesmo computador e respetivo ecrã. Previamente à medição de cada implante, foi sempre realizada a calibração do programa utilizando como referência fixa o comprimento do implante e do pilar de cicatrização.

Na avaliação radiológica foi determinada a distância em milímetros entre o ombro do implante (ODI) e o contacto mais coronal entre o osso e o implante (cOI) na face mesial e distal de cada implante (Fig. 3.24).

Após a medição da distância radiográfica ODI-cOI em todos os implantes determinou-se a média e desvio padrão de ambos os grupos (IC e IT), para cada período de avaliação (S0, S3, S6, S9, S12, S15 e S17). Da mesma forma, foi calculada a variação da distância ODI-cOI entre o dia de colocação (S0) e as restantes avaliações, nomeadamente S0-S3, S0-S6, S0-S9, S0-S12, S0-S15 e S0-S17, determinando-se assim a variação do nível ósseo desde S0 (perda óssea radiográfica).

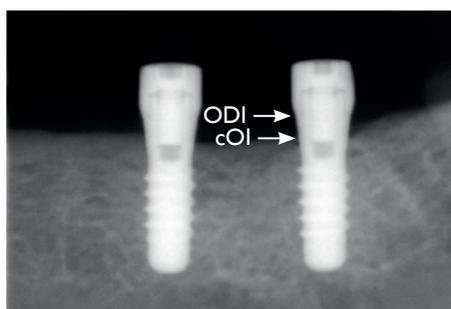


Figura 3.24 – Imagem de radiovisiografia de dois implantes e respetivos pilares de cicatrização à semana 0 (S0).
(ODI – ombro do implante; cOI – contacto mais coronal entre o osso e o implante)

2.3.2 – Análise microbiológica

A análise da colheita microbiológica realizada com os cones de papel foi efetuada com recurso à RT-PCT.

Para além do DNA correspondente à totalidade de bactérias presentes na amostra (Bactérias Totais) quantificou-se o DNA ($\mu\text{g (DNA)/ml}$ de solução) das seguintes bactérias: Género *Streptococcus* (*Streptococcus spp*); Género *Fusobacterium* (*Fusobacterium spp*); *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*); *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) e *Prevotella intermedia* (*Pi*).

Obtida a quantificação do DNA das bactérias totais e do DNA específico para cada bactéria pesquisada em cada período experimental, procedeu-se para cada uma delas à seguinte análise:

- comparação, ao longo do protocolo experimental, entre o grupo IC e IT (comparação intergrupo);
- comparação entre a primeira e a última colheita, realizadas no mesmo implante, para cada um dos grupos (comparação intragrupo).

2.3.3 – Análise histológica

A análise histológica compreendeu uma análise qualitativa, com observação e registos das imagens, bem como um estudo quantitativo de alguns parâmetros.

A observação das lâminas foi efetuada com recurso a um microscópio óptico de campo claro (Nikon® Eclipse 600, Japan) e estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1500, Japan) com dispositivo de reforço de luz por fibra (Intralux® 5000-I, Switzerland). Ambos os equipamentos possuíam capacidade de conexão a equipamento fotográfico convencional (Nikon® FDX-35, com sensor multiponto NikonR U-III, Japan) e digital (Nikon® Digital Camera DXM-1200 C, Japan), bem como a câmara de vídeo digital (Optronics® DEI 750D CE, USA), ligadas a computadores PC (Intel®Pentium™ III e Intel®Core™ 2 Duo Core™) e monitor (Sony® Trinitron, Japan). Estes computadores possuem instalado *software* para fotografia, análise de imagem (Nikon®ACT-I C, Japan) e histomorfometria (Bioquant Osteo®2012 Bioquant™ – Image Analysis Corporation, USA).

2.3.3.1 – Descrição histológica qualitativa

A análise qualitativa dos cortes histológicos consistiu na deteção e caracterização de estruturas histológicas peri-implantares, procedendo-se ao registo histomorfológico, bem como à deteção de presença ou ausência de resposta inflamatória, placa bacteriana e cálculos.

A coloração por Azul de Toluidina (corante básico) cora os componentes ácidos com distintas gradações de azul, sendo possível distinguir tecido osteóide e tecido ósseo mineralizado bem como o componente celular. A sua metacromasia permite igualmente estabelecer conclusões sobre aposição e reabsorção óssea.

Para realizar a descrição histológica qualitativa foram utilizadas ampliações de X2, X10, X20, X40 e X100.

2.3.3.2 – Descrição histológica quantitativa – histomorfometria

Para realização da histomorfometria através da observação das lâminas ao microscópio foram realizadas imagens com ampliação de X2. Quando necessário identificar alguma particularidade mais específica de forma a permitir uma correta histomorfometria utilizaram-se ampliações de X4 ou X10.

As imagens histológicas foram analisadas recorrendo ao *software* específico (Bioquant Osteo®2012 Bioquant™, USA). Este programa apresenta a capacidade de distinguir as diferentes afinidades tintoriais dos tecidos e componentes da amostra, convertendo essa informação em quantificação de áreas e outros parâmetros. Esta quantificação foi importante para a avaliação da percentagem do infiltrado inflamatório presente na *Region Of Interest* (ROI). A unidade de medida utilizada foi o micrómetro (μm).

A calibração do programa e respetiva análise foram realizadas sempre pelo mesmo operador o qual, antes de iniciar cada sessão de mensuração, verificava a calibração intra-examinador. Esta calibração foi realizada utilizando uma régua padronizada, a qual se encontrava integrada numa lâmina para observação ao microscópio fornecida pelo fabricante do *software*.

De modo a ser possível realizar a histomorfometria foram identificadas as seguintes referências morfológicas (Fig. 3.25):

- margem gengival: MG
- zona apical do epitélio sulcular: aES
- zona apical do epitélio juncional: aEJ
- crista óssea: CO
- ombro do implante: OI

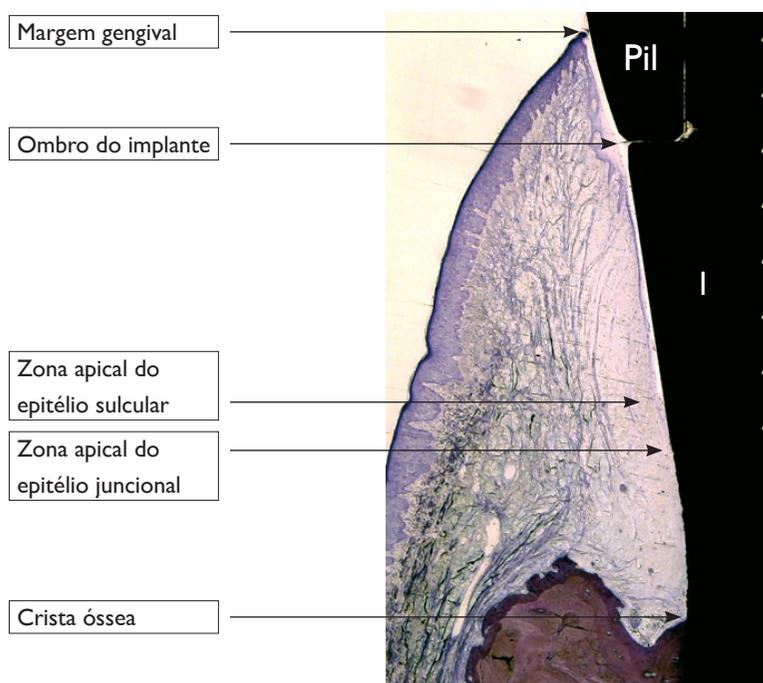


Figura 3.25 – Imagem histológica representativa dos tecidos peri-implantares e implante (I). Pilar de cicatrização (Pil). 2X no original. (AT).

2.3.3.2.1 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ)

Foi realizada a medição linear nas faces vestibular, lingual, mesial e distal de cada implante. Foram tomados como pontos de referência a margem gengival (MG) e o limite apical do epitélio Juncional (aEJ). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.2 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES)

Realizou-se a medição linear nas quatro faces de cada implante: vestibular, lingual, mesial e distal. Foram tomados como pontos de referência a margem gengival (MG) e o limite apical do epitélio sulcular (aES). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.3 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio sulcular (CO-aES)

Da mesma forma esta medição foi realizada de modo linear nas faces vestibular, lingual, mesial e distal, de cada implante. Foram tomados como pontos de referência a crista óssea (CO) e o limite apical do epitélio sulcular (aES). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.4 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio juncional (CO-aEJ)

Esta medição foi realizada linearmente nas faces vestibular, lingual, mesial e distal de cada implante. Foram tomados como pontos de referência a crista óssea (CO) e o limite apical do epitélio juncional (aEJ). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.5 – Distância da crista óssea à margem gengival (CO-MG)

Foi realizada a medição linear nas faces vestibular, lingual, mesial e distal de cada implante. Foram tomados como pontos de referência a crista óssea (CO) e a margem gengival (MG). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.6 – Distância do ombro do implante à margem gengival (OI-MG)

Foi efectuada uma medição linear nas quatro faces de cada implante: vestibular, lingual, mesial e distal. Os pontos de referência utilizados foram o ombro do implante (OI) e a margem gengival (MG). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.7 – Distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO)

Mediu-se a distância linear nas faces vestibular, lingual, mesial e distal de cada implante. Foram tomados como pontos de referência o ombro do implante (OI) e a crista óssea (CO). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.8 – Distância da margem gengival à zona apical do infiltrado inflamatório (MG-aINF)

Esta medição foi realizada linearmente na face vestibular do implante. Foram tomados como pontos de referência a margem gengival (MG) e o limite apical do infiltrado inflamatório (aINF). Esta medição foi realizada com uma ampliação de X2.

2.3.3.2.9 – Percentagem de infiltrado inflamatório (%INF)

O cálculo percentual do infiltrado inflamatório foi realizado na face vestibular de cada implante. Na zona de tecido mole peri-implantar localizada ao nível do ombro/colo do implante foi definida uma área fixa para todos os implantes – ROI – *Region Of Interest*. Dentro dessa zona foi quantificada a área ocupada por células inflamatórias. Esta quantificação foi realizada automaticamente pelo *software* o qual identifica aquelas células devido à sua distinta afinidade tintorial para o Azul de Toluidina. No final desta quantificação o operador, caso seja necessário, identifica manualmente as células inflamatórias remanescentes não identificadas pelo *software*. Posteriormente calculou-se a percentagem que essas células ocupavam no ROI pré-definido. Esta medição foi realizada com uma ampliação de X10.

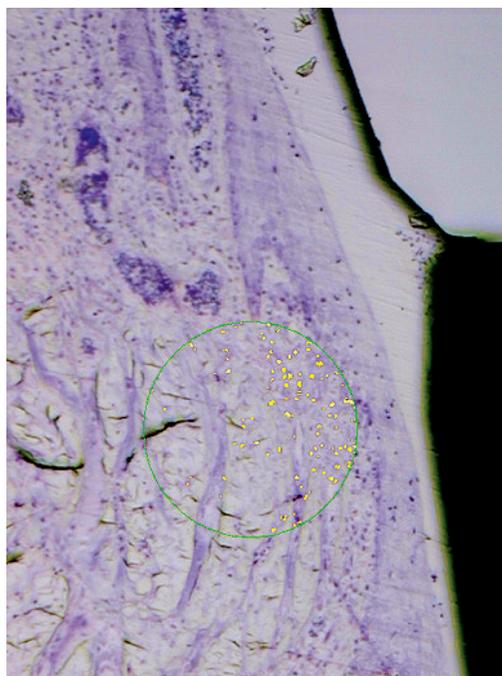


Figura 3.26 – Imagem histológica com a *Region of Interest* (ROI) (círculo verde) e identificação das células inflamatórias no seu interior (amarelo). 10X no original. (AT).

2.3.4 – Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com recurso ao programa estatístico *IBM Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, IBM®, USA, versão 21), assumindo um nível de significância de 0,05.

As variáveis medidas foram estudadas por técnicas comuns de estatística descritiva apresentando-se as medidas de tendência central e de dispersão sempre que se justifica. O comportamento das mesmas variáveis também foi descrito por intermédio de gráficos apropriados.

Foi verificado o pressuposto da normalidade das variáveis para a aplicação de testes paramétricos com o teste Shapiro-Wilk.

Para avaliar a evolução da variável ao longo de todo o procedimento experimental foi efetuada uma análise ANOVA para medidas repetidas tendo em conta o grupo implantes teste e o grupo implantes controlo e testes *t-student post-hoc*, no caso de se verificar normalidade.

Quando tal não se verificava, optou-se por realizar um teste de Friedman para avaliar a evolução da variável ao longo de todo o procedimento experimental e testes *post-hoc* (Wilcoxon) para comparações múltiplas.

De igual forma, para medidas independentes, utilizou-se t-student para amostras independentes quando se verificou normalidade e Mann-Whitney nos outros casos.

De forma a verificar a correlação entre algumas variáveis no final do protocolo experimental, foi realizado o Coeficiente de Correlação de Spearman.

De forma a determinar a potência do procedimento experimental foi utilizado software GPower (versão 3.1.3) (University Kiel, Germany), usando a variável PS à semana 17, como variável principal.

3 – Resultados

3.1 – Avaliação do estado de saúde geral dos animais e avaliação clínica da cavidade oral

Durante todo o período experimental os animais apresentaram um estado de saúde geral constante, sem manifestação de qualquer sinal ou sintoma clínico de mau estar ou qualquer patologia.

Após as cirurgias, quer da extração dos dentes quer para a colocação dos implantes, todos os cães tiveram uma recuperação pós-operatória normal, sempre acompanhados pela equipa veterinária da unidade onde se encontravam instalados.

O peso de todos os animais aumentou ao longo do procedimento experimental. O peso imediatamente antes das extrações dentárias, da colocação dos implantes e da eutanásia são apresentados em anexo, na tabela A.

Na observação oral em cada um dos períodos experimentais não foram visíveis lesões compatíveis com qualquer tipo de patologia. No entanto, foi notória a presença considerável de tártaro nos molares superiores, antagonistas dos implantes, bem como nos segundos molares mandibulares, apesar de nestes últimos o tártaro estar em menor quantidade.

3.2 – Análise macroscópica

Após a disseção dos tecidos moles mandibulares as observações clínicas macroscópicas não mostraram alterações patológicas nem a presença de processos inflamatórios visíveis para além dos danos expectáveis e decorrentes do processo cirúrgico. Estes resultados foram complementados com a necrópsia, através de biópsias colhidas nos diversos órgãos (coração, fígado, rim, baço e gânglios linfáticos da cadeia loco-regional) para análise histopatológica.

3.3 – Cálculo da potência

O cálculo da potência do teste foi realizado com o software GPower (versão 3.1.3), tendo sido usada a variável “profundidade de sondagem” à 17ª semana como variável principal. O tamanho do efeito (*effect size*) determinado foi de 1,66 sendo o número de elementos, quer no grupo implantes controlo quer no grupo implantes teste, igual a 12. Considerando um valor de significância de 0,05 e um teste paramétrico bilateral a potência obtida foi de 0,97.

3.4 – Resultados clínicos

3.4.1 – Presença de placa bacteriana (PPB)

Para o grupo implantes controlo (IC) verificou-se que ao longo do procedimento experimental apenas as semanas 9 e 15 apresentaram placa bacteriana. Para a S9 a sua média e desvio padrão foi de $18,75 \pm 15,54$ enquanto para a S15 foi de $22,92 \pm 7,22$ (tabela 3.3). Em termos absolutos aquelas percentagens correspondem a 9/48 faces para a S9 e 11/48 faces para a S15.

Tabela 3.3 – Presença de placa bacteriana ao longo do procedimento experimental para ambos os grupos (média e desvio padrão; $\bar{x} \pm s$).

Presença de Placa Bacteriana (%)						
	S3**	S6**	S9**	S12**	S15**	S17**
IC*	0,00±0,00	0,00±0,00	18,75±15,54	0,00±0,00	22,92±7,22	0,00±0,00
IT	72,92±24,91	72,92±19,82	79,17±20,87	77,08±12,87	77,08±19,82	81,25±11,31

* $p < 0.001$ (Intragrupo); ** $p < 0.001$ (Intergrupo).

Verificou-se que a variável PPB para o grupo implantes controlo, apresentou uma variação longitudinal estatisticamente significativa ($\chi^2(5)=46.849$, $p < 0.001$). Assim, em relação à S3 detetou-se uma diferença estatisticamente significativa entre S3-S9 ($p=0,007$) e S3-S15 ($p=0,001$). Ao longo das avaliações semanais consecutivas encontrou-se igualmente uma variação estatisticamente significativa entre S6-S9, S9-S12, S12-S15 e S15-S17 (tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Valor de p , para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável PPB.

valor p (implantes controlo)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	1,000	0,007*	1,000	0,001*	1,000
S6		0,007*	1,000	0,001*	1,000
S9			0,007*	0,317	0,007*
S12				0,001*	1,000
S15					0,001*

($\bar{p} < 0.05$) (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

Para o grupo dos implantes teste verificou-se a presença de placa bacteriana imediatamente na primeira avaliação na S3 (72.92±24.91). Em termos absolutos estes valores correspondem a 35/48 faces que compõem este grupo de implantes. Verificou-se que ao longo do modelo experimental este valor foi sofrendo algumas alterações ligeiras e, apesar de se manter igual na S6, subiu ligeiramente na S9 (79.17±20.87) para de seguida descer ligeiramente na S12 (77.08±12.87), mantendo-se quase igual na S15 (77,08±19.82) e terminar na S17 com o valor mais elevado (81.25±11.31) (tabela 3.3).

Verificou-se que a variável PPB para os implantes teste não apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5)=3.453$, $p=0,630$).

No respeitante à comparação entre grupos implantes controlo / implantes teste observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($U = 51.00$, $S = 2679.00$, $p < 0.001$), verificando-se que a percentagem de PPB é significativamente superior no grupo implantes teste (gráfico 1).

A avaliação de diferenças intergrupos (IC vs. IT), em todas as semanas, está apresentada em anexo, na tabela D.

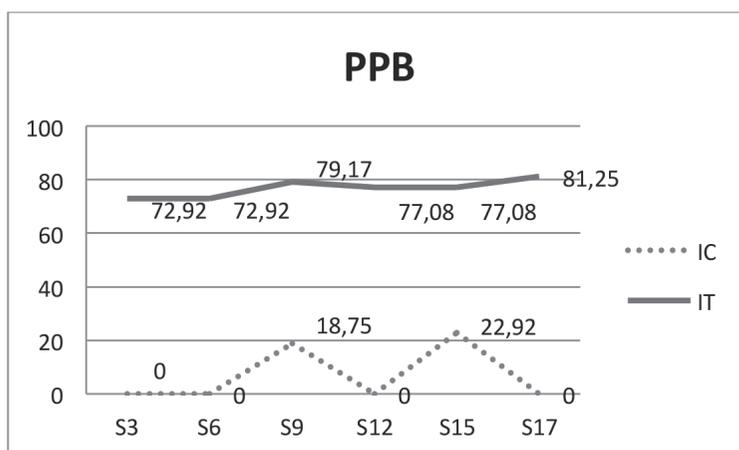


Gráfico I – Média da percentagem de PPB ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT)..

3.4.2 – Mucosite peri-implantar (MPI)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que ao longo do procedimento experimental apenas na semana 12 foi visível a presença de um caso isolado de mucosite peri-implantar, sendo a respetiva média e desvio padrão de $2,08 \pm 7,22$ (tabela 3.5). Em termos absolutos este valor corresponde à presença de MPI em apenas uma das 48 faces deste grupo, para a semana em avaliação.

Tabela 3.5 – Presença de MPI ao longo do procedimento experimental (média e desvio padrão; $\bar{x} \pm s$).

Mucosite Peri-implantar (%)						
	S3**	S6**	S9**	S12**	S15**	S17**
IC	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,08±7,22	0,00±0,00	0,00±0,00
IT*	25,00±26,11	33,33±19,46	39,58±19,82	45,83±23,44	56,25±21,65	60,42±12,87

* $p < 0,001$ (Intragrupo); ** $p < 0,001$ (Intergrupo).

A variável MPI para o grupo implantes controlo não apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas ($\chi^2(5) = 5,000$, $p = 0,416$).

Para o grupo implantes teste verificou-se a presença de MPI ao longo de todo o procedimento experimental. A sua média e desvio padrão para a S3 foi de $25,00 \pm 26,11$ e este valor foi aumentando gradualmente ao longo do tempo experimental até atingir o seu valor máximo na S17 ($60,42 \pm 12,87$) (tabela 3.5). Àqueles valores corresponde uma variação do número absoluto de faces com MPI de 12/48, na S3, para 29/48 na S17.

Verificou-se que a variável MPI para o grupo implantes teste apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5) = 25,466$, $p < 0,001$). Relativamente à observação inicial (S3) verificamos haver uma diferença estatisticamente significativa entre S3-S12 ($p = 0,005$), S3-S15 ($p < 0,001$) e entre S3-S17 ($p < 0,001$). Analisando a sua evolução ao longo das semanas verificou-se que a MPI, em relação à semana imediatamente anterior, não apresenta diferenças estatisticamente significativas (tabela 3.6).

Tabela 3.6 – Valor de p para o grupo IT ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável MPI.

		valor p (implantes teste)				
		S6	S9	S12	S15	S17
S3		0,276	0,076	0,005*	<0,001*	<0,001*
S6			0,482	0,076	0,001*	<0,001*
S9				0,276	0,008*	0,001*
S12					0,104	0,026*
S15						0,532

(* $p < 0.05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

No que respeita à comparação entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($U = 266.50$, $S = 2894.50$, $p < 0,001$), verificando-se que a percentagem de MPI é superior no grupo implantes teste (gráfico 2). Da observação da tabela E (anexos) verifica-se haver uma diferença estatisticamente significativa intergrupos em todas as semanas.

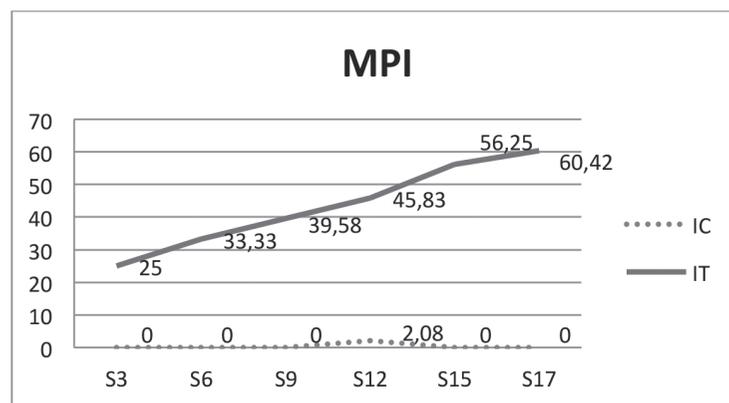


Gráfico 2 – Média da percentagem de MPI ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT)..

3.4.3 – Profundidade de sondagem (PS)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que a PS (média e desvio padrão) mais baixa foi detetada na primeira semana de avaliação, isto é na S3 ($1,08 \pm 0,15$ mm), tendo posteriormente havido um aumento deste valor até S9 ($1,92 \pm 0,32$ mm). Entre S9 e S15 a PS diminuiu, tendo atingido o valor de $1,64 \pm 0,39$ mm na S15. Na última sondagem, na S17, apresentou o valor de $1,83 \pm 0,17$ mm (tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) da “profundidade de sondagem” ao longo do procedimento experimental.

		Profundidade de Sondagem (mm)					
		S3**	S6**	S9**	S12**	S15**	S17**
IC*		$1,08 \pm 0,15$	$1,83 \pm 0,33$	$1,92 \pm 0,32$	$1,81 \pm 0,26$	$1,64 \pm 0,39$	$1,83 \pm 0,17$
IT*		$1,97 \pm 0,59$	$2,08 \pm 0,32$	$2,39 \pm 0,37$	$2,39 \pm 0,31$	$2,39 \pm 0,24$	$2,44 \pm 0,38$

* $p < 0.001$ (Intragrupo); ** $p < 0.001$ (Intergrupo).

Verificou-se que a variável PS para o grupo implantes controlo apresentava uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5) = 30.363$, $p < 0,001$). Relativamente à sondagem inicial (S3) verificou-se que todas as restantes apresentam diferenças estatisticamente significativas. Quando consideramos as sondagens consecutivas, ao longo das várias semanas, apenas se detetou uma diferença estatisticamente significativa entre S3-S6 ($p = 0,002$). Para além do já referido também se determinou uma diferença estatisticamente significativa entre S9-S15 (tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Valor de p , para o grupo implantes controlo para variável “profundidade de sondagem” ao longo das semanas de procedimento experimental.

valores p (implantes controlo)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,002*	0,002*	0,003*	0,007*	0,002*
S6		0,507	0,782	0,191	1,000
S9			0,340	0,031*	0,558
S12				0,250	0,705
S15					0,159

(* $p < 0,05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

Para o grupo implantes teste verificou-se um aumento gradual da PS ao longo do procedimento experimental, desde a S3 onde foi registado o valor mínimo ($1,97 \pm 0,59$ mm) até ao valor máximo obtido na S17 ($2,44 \pm 0,38$ mm). Entre a S9 e a S15 houve uma estabilização da PS (tabela 3.7).

Verificou-se que a variável PS para o grupo implantes teste apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5) = 21.239$, $p = 0,001$). Relativamente à sondagem inicial (S3), verificou-se que há diferenças estatisticamente significativas entre S3-S17 ($p = 0,031$), S3-S15 ($p = 0,034$) e S3-S17 ($p = 0,041$). Quando se considerou as sondagens consecutivas, ao longo das várias semanas, apenas se detetou uma diferença estatisticamente significativa entre S6-S9 ($p = 0,027$). Também se encontrou uma diferença estatisticamente significativa entre S6-S12 ($p = 0,031$), S6-S15 ($p = 0,021$) e S6-S17 ($p = 0,010$) (tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “profundidade de sondagem”

valores p (implantes teste)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,204	0,031*	0,057	0,034*	0,041*
S6		0,027*	0,031*	0,021*	0,010*
S9			1,000	1,000	0,483
S12				1,000	0,430
S15					0,608

(* $p < 0,05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

No respeitante à comparação entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste observou-se diferenças estatisticamente significativas entre ambos ($U = 782.50$, $S = 3410.50$, $p < 0,001$). Verificou-se que a média de PS é superior no grupo implantes teste (gráfico 3). Esta diferença entre ambos os grupos está presente em todas as semanas com exceção da S6 ($p = 0,06$) (anexo – tabela F).

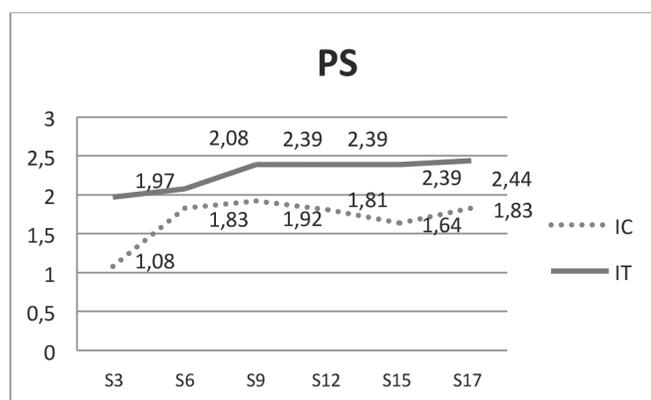


Gráfico 3 – Média da PS ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

3.4.4 – Hemorragia após sondagem (HS)

Para o grupo implantes controlo, a média e desvio padrão da percentagem do número de faces com HS oscilou entre $2,78 \pm 9,62$ na primeira sondagem (S3) e $13,89 \pm 22,29$ na S6. Na última avaliação, realizada na S17, o seu valor foi $0,00 \pm 0,00$ (tabela 3.10). A estas médias e desvios padrão correspondem os valores absolutos de 1 em 36 faces avaliadas na S3 (1/36) e o valor máximo de 5/36 faces na S6.

Tabela 3.10 – Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) para a variável “hemorragia após sondagem” ao longo do procedimento experimental.

Hemorragia após sondagem (%)						
	S3	S6	S9**	S12**	S15**	S17**
IC	2,78±9,62	13,89±22,29	2,78±9,62	8,33±15,08	5,56±19,25	0,00±0,00
IT*	44,44±38,49	58,33±25,13	75,00±25,13	63,44±26,43	91,67±20,72	85,33±17,41

* $p < 0,001$ (Intragrupo); ** $p < 0,001$ (Intergrupo).

Verificou-se que a variável HS para o grupo implantes controlo não apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5)=9,419$, $p=0,093$).

Para o grupo implantes teste, a média e desvio padrão da percentagem do número de faces com HS também variou, mas sempre entre valores mais elevados quando comparados com o grupo implantes controlo. O seu valor mais baixo foi $44,44 \pm 38,49$ e o mais elevado $91,67 \pm 20,72$, obtidos na S3 e S15, respetivamente. Na última semana de avaliação (S17) obteve-se um valor de $85,33 \pm 17,41$ (tabela 3.10). A estas médias e desvios padrão correspondem os valores absolutos de 16 faces (S3), 33 faces (S15) e 30 faces na S17, para um total de 36 faces.

Verificou-se que a variável HS para o grupo implantes teste apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5)=18,949$, $p=0,002$). Relativamente à sua comparação com a observação inicial (S3) verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre S3-S15 ($p=0,001$) e S3-S17 ($p=0,010$). Para além destas, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre S6-S15 ($p=0,008$) (tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Valor de p , para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental e para a variável “hemorragia após sondagem”

valor p (implantes teste)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,513	0,056	0,173	0,001*	0,010*
S6		0,210	0,478	0,008*	0,056
S9			0,585	0,156	0,513
S12				0,050	0,230
S15					0,445

(* $p < 0,05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

No respeitante à comparação entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($U = 268,00$, $S = 2896,00$, $p < 0,001$). O valor da percentagem de faces com HS é superior no grupo implantes teste (gráfico 4). Estas diferenças estão presentes em todas as semanas avaliadas (anexos – tabela G).

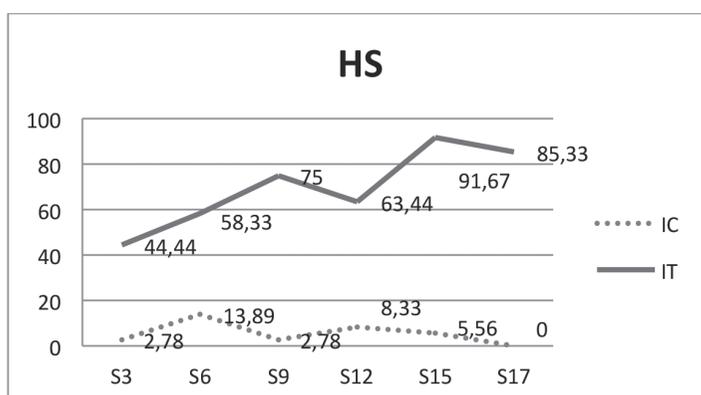


Gráfico 4 – Média da percentagem de HS ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

3.4.5 – Nível da margem gengival (NMG)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que o NMG (média e desvio padrão) na S3 foi de $2,42 \pm 0,37$ mm e o seu valor mais baixo foi avaliado na S15 ($2,38 \pm 0,33$ mm). No final do procedimento experimental (S17) registou-se o valor mais elevado de NMG ($2,75 \pm 0,40$ mm) (tabela 3.12).

Tabela 3.12 – Representação da média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) para a variável “nível da margem gengival” ao longo do procedimento experimental.

Nível da margem gengival (mm)						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
IC*	$2,42 \pm 0,37$	$2,44 \pm 0,36$	$2,54 \pm 0,28$	$2,63 \pm 0,47$	$2,38 \pm 0,33$	$2,75 \pm 0,40$
IT*	$2,42 \pm 0,27$	$2,31 \pm 0,34$	$2,71 \pm 0,37$	$2,63 \pm 0,33$	$2,60 \pm 0,53$	$2,71 \pm 0,40$

* $p < 0,001$ (Intragrupo); ** $p < 0,001$ (Intergrupo)

Verificou-se que a variável NMG para o grupo implantes controlo apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5) = 15,301$, $p = 0,009$). Contudo, considerando todas as medições em relação à inicial (S3), verificou-se que apenas a S17 apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,011$) (tabela 3.13). Quando se consideram as medições consecutivas, ao longo das várias semanas, apenas se detetou uma diferença estatisticamente significativa entre S15-S17 ($p = 0,011$). Porém encontraram-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre S6-S17 ($p = 0,016$), S9-S15 ($0,021$) e S9-S17 ($0,039$) (tabela 3.13).

Tabela 3.13 – Valor de p para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental e para a variável “nível da margem gengival”

valor p (implantes controlo)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,763	0,141	0,065	0,710	0,011*
S6		0,272	0,101	0,603	0,016*
S9			0,431	0,021*	0,039*
S12				0,065	0,063
S15					0,011*

(* $p < 0,05$) (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

Para o grupo implantes teste verificou-se que o NMG (média e desvio padrão) na S3 foi de $2,42 \pm 0,27$ mm e o seu valor mais baixo foi avaliado na S6 ($2,31 \pm 0,34$ mm). No final do procedimento experimental (S17) o NMG obteve o seu valor mais elevado, $2,71 \pm 0,40$ mm (tabela 3.12).

A variável NMG, para o grupo implantes teste, apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2(5)=20,099$, $p=0,001$). Relativamente à primeira medição (S3), verificou-se que S9 e S17 apresentam uma diferença estatisticamente significativa, respetivamente $p=0,016$ e $p=0,034$ (tabela 3.14). Quando se considerou as medições consecutivas, ao longo das várias semanas, apenas se detetou uma diferença estatisticamente significativa entre S6-S9 ($p=0,003$), porém encontrou-se ainda diferenças estatisticamente significativas entre S6-S12 ($p=0,010$) e S6-S17 ($p=0,004$) (tabela 3.14).

Tabela 3.14 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível da margem gengival”

valor p (implantes teste)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,272	0,016*	0,046	0,217	0,034*
S6		0,003*	0,010*	0,075	0,004*
S9			0,366	0,327	0,730
S12				0,834	0,248
S15					0,187

(* $p < 0,05$) (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

No respeitante à comparação entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 5) não se observam diferenças estatisticamente significativas ($U = 2501,50$, $S = 5129,50$, $p=0,712$), como visível na tabela 3.12 e no gráfico 5.

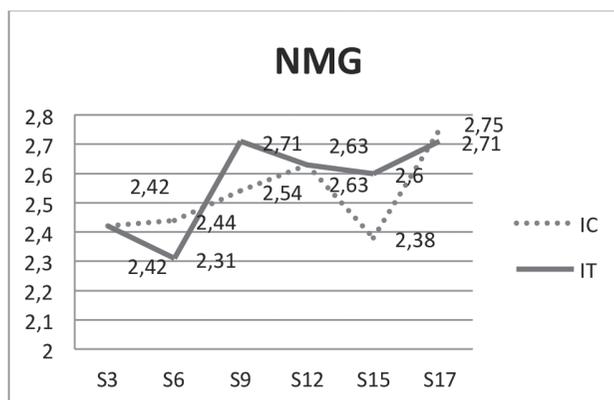


Gráfico 5 – Média do NMG ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

3.4.6 – Nível de inserção clínico (NIC)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que na S3 se obteve o valor (média e desvio padrão) mais reduzido de NIC ($3,42 \pm 0,43$ mm). Este foi aumentando até à S12 ($4,44 \pm 0,50$ mm), tendo depois diminuído em S15 ($3,94 \pm 0,55$ mm). Por fim terminou com o valor mais elevado na S17 ($4,58 \pm 0,53$ mm) (tabela 3.15).

Tabela 3.15 – Representação da média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) para a variável “nível de inserção clínico”.

Nível de Inserção Clínico (mm)						
	S3**	S6	S9**	S12**	S15**	S17**
IC*	3.42±0.43	4.25±0.47	4.36±0.41	4.44±0.50	3.94±0.55	4.58±0.53
IT*	4.36±0.81	4.39±0.40	5.08±0.49	5.06±0.55	4.94±0.57	5.17±0.52

* p<0.001 (Intragrupo).

Verificou-se que a variável NIC para o grupo implantes controlo apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2_f(5)=33.989$, p<0,001). Em relação à primeira medição realizada na S3 verificou-se que todas as semanas apresentavam uma diferença estatisticamente significativa, nomeadamente entre S3-S6 (p=0,003), S3-S9 (p=0,002), S3-S12 (p=0,003) S3-S15 (p=0,016) e S13-S17 (p=0,003) (tabela 3.16). Quando consideradas as medições consecutivas ao longo das várias semanas detetou-se uma diferença estatisticamente significativa entre S12-S15 (p=0,015), S15-S17 (p=0,004), S6-S17 (p=0,028) e S9-S15 (p=0,023) (tabela 3.16)

Tabela 3.16 – Valor de p para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível de inserção clínico”

valores p (implantes controlo)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,003*	0,002*	0,003*	0,016*	0,003*
S6		0,550	0,083	0,048	0,028*
S9			0,619	0,023*	0,345
S12				0,015*	0,096
S15					0,004*

(*p<0.05) (Teste post-hoc Wilcoxon).

Para o grupo implantes teste a variável NIC apresentou o valor mais reduzido na S3 (4,36 ± 0,81 mm) e o mais elevado na S17 (5,17 ± 0,52 mm) (tabela 3.15). Neste grupo, o NIC apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17 ($\chi^2_f(5)=31.944$, p<0,001). Em relação à primeira avaliação realizada na S3, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre S3-S9 (p=0,016), S3-S12 (p=0,032), S3-S15 (p=0,031) e S3-S17 (p=0,034) (tabela 3.17). Considerando as medições consecutivas, ao longo das semanas consecutivas detetamos uma diferença estatisticamente significativa entre a S6-S9 (p=0,003). Encontramos ainda diferenças estatisticamente significativas entre S6-S12 (p=0,003), S6-S15 (p=0,005) e S6-S17 (p=0,004).

Tabela 3.17 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível de inserção clínico”

valores p (implantes teste)					
	S6	S9	S12	S15	S17
S3	0,605	0,010*	0,032*	0,031*	0,039*
S6		0,003*	0,003*	0,005*	0,002*
S9			0,863	0,272	0,608
S12				0,509	0,417
S15					0,185

(*p<0.05) (Teste post-hoc Wilcoxon).

No respeitante à comparação entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste observaram-se diferenças estatisticamente significativas (U = 1220.50, S = 3848.50, p < 0,001) (anexo – tabela H), verificando-se que a média de NIC foi superior no grupo implantes teste (gráfico 6). Estas diferenças entre ambos os grupos estão presentes em todas as semanas com exceção da S6 (anexo – tabela H).

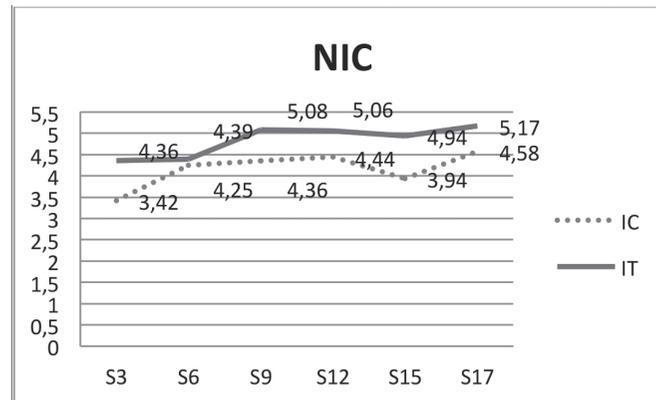


Gráfico 6 – Média do NIC ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

3.4.7 – Supuração

Não foi detectada supuração após sondagem em qualquer dos implantes de ambos os grupos, ao longo de todo o procedimento experimental (tabela 3.18).

Tabela 3.18 – Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) para a variável “supuração” ao longo do procedimento experimental para ambos os grupos.

Supuração (%)						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
IC	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
IT	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

3.5 – Resultados radiográficos

A distância ODI-cOI foi avaliada através da medição, em milímetros, da distância entre o ombro do implante e o contacto mais coronal entre o osso e o implante. Esta distância foi medida nas faces mesial e distal de cada implante, em cada uma das semanas experimentais. Com estes valores de ambas as faces foi determinada a média e desvio padrão para cada grupo de implantes nas respetivas semanas.

Tabela 3.19 – Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) (mm) para a variável ODI-cOI ao longo do procedimento experimental.

Distância ODI-cOI (mm)							
	S0	S3	S6	S9	S12	S15	S17
IC ($\bar{x} \pm s$)	1,21 ± 0,49	1,32 ± 0,50	1,45 ± 0,55	2,07 ± 0,57	1,94 ± 0,57	1,87 ± 0,57	1,91 ± 0,63
IT ($\bar{x} \pm s$)	1,22 ± 0,35	1,44 ± 0,41	1,58 ± 0,64	2,16 ± 0,70	1,89 ± 0,70	1,89 ± 0,70	2,03 ± 0,64

Para o grupo implantes controlo verificou-se que a distância ODI-cOI, aumentou até à S9 (2,07±0,57mm), de seguida reduziu até à S15 (1,87±0,57mm), tendo aumentado ligeiramente até ao término do procedimento experimental (S17) (1,91±0,63mm) (tabela 3.19).

Para o grupo implantes teste verificou-se que a menor distância ODI-cOI (média e desvio padrão) foi obtida na S0 ($1,22 \pm 0,35$). Na S9 registou-se o valor mais elevado ($2,16 \pm 0,70$) e no final do procedimento experimental registou-se o valor de $2,03 \pm 0,64$ (tabela 3.19).

No que concerne à variação da distância ODI-cOI relativamente à S0, isto é, a perda óssea radiográfica, verifica-se que para o grupo implantes controlo essa perda foi de $0,11 \pm 0,36$ mm entre S0-S3 tendo atingido o seu valor máximo no período S0-S9 (tabela 3.20).

Tabela 3.20 – Média e desvio padrão ($\bar{x} \pm s$) (mm) da variação da distância ODI-cOI em relação a S0.

	Variação da distância ODI-cOI (mm) (Perda Óssea Radiográfica)					
	S0-S3	S0-S6	S0-S9	S0-S12	S0-S15	S0-S17
IC ($\bar{x} \pm s$)	$0,11 \pm 0,36$	$0,25 \pm 0,37$	$0,87 \pm 0,43$	$0,73 \pm 0,42$	$0,66 \pm 0,42$	$0,70 \pm 0,51$
IT ($\bar{x} \pm s$)	$0,22 \pm 0,25$	$0,36 \pm 0,60$	$0,94 \pm 0,60$	$0,67 \pm 0,62$	$0,67 \pm 0,64$	$0,81 \pm 0,47$

Da comparação intragrupo quanto à perda óssea radiográfica ao longo das semanas, verificou-se que relativamente à variação inicial (S0-S3) todas as outras tinham diferenças estatisticamente significativas com exceção da S0-S6 ($p=0,273$). A partir da S9 deixou de haver diferenças estatisticamente significativas (tabela 3.21).

Tabela 3.21 – Valor de p para o grupo implantes controlo para a variável ODI-cOI.

	valores p (implantes controlo)				
	S0-S6	S0-S9	S0-S12	S0-S15	S0-S17
S0-S3	0,273	0,000*	0,001*	0,002*	0,001*
S0-S6		0,000*	0,011*	0,025*	0,023*
S0-S9			0,191	0,074	0,107
S0-S12				0,075	0,594
S0-S15					0,52

(* $p<0,05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

Para os implantes teste a variação da distância ODI-cOI em relação à S0 aumentou até à S9 ($0,94 \pm 0,60$ mm). Após este período diminuiu na S12 e S15 para de seguida aumentar na última avaliação do procedimento experimental (S17) ($0,81 \pm 0,47$ mm) (tabela 3.20).

Da comparação intragrupo da perda óssea radiográfica ao longo das semanas, verificou-se que relativamente à variação inicial (S0-S3) todas as outras apresentavam diferenças estatisticamente significativas com exceção da S0-S6 ($p=0,380$) (tabela 3.22).

Tabela 3.22 – Valor de p para o grupo implantes teste para a variável OI-cOI.

	valores p (implantes teste) - comparação inter-semanas				
	S0-S6	S0-S9	S0-S12	S0-S15	S0-S17
S0-S3	0,380	0,001*	0,031*	0,039*	0,003*
S0-S6		0,000*	0,006*	0,011*	0,018*
S0-S9			0,015*	0,073	0,474
S0-S12				1	0,291
S0-S15					0,298

(* $p<0,05$). (Teste *post-hoc* Wilcoxon).

Apesar de se terem observado diferenças na perda óssea radiográfica ao longo das semanas, quer para o grupo implantes teste quer para o grupo implantes controlo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre ambos ($F(1,21) = 0.128$; $p = 0,724$) (tabela 3.20) (gráfico 7).

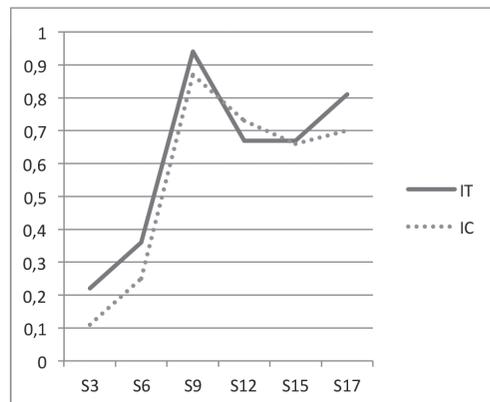


Gráfico 7 – Média da variação da distância ODI-cOI (perda óssea radiográfica), em relação à semana inicial (S0), avaliada radiograficamente, para o grupo implantes controlo e grupo implantes teste.

3.6 – Resultados microbiológicos

3.6.1 – Resultados intergrupos: implantes controlo vs implantes teste

3.6.1.1 – Bactérias totais

As bactérias totais, quer no grupo implantes controlo quer no implantes teste foram quantificadas em todos os animais e em todos os períodos experimentais (anexo – tabela I). A deteção e quantificação de DNA ($\mu\text{g/ml}$ de solução) das bactérias totais na S3 foi de $1,7920 \pm 1,5037 \mu\text{g (DNA)/ml}$. Este valor sofreu variação ao longo do procedimento experimental, atingindo o valor máximo na S15 ($2,1613 \pm 1,4340 \mu\text{g (DNA)/ml}$) e na S17 a quantidade total de DNA bacteriano detetado foi de $0,0556 \pm 0,1262 \mu\text{g (DNA)/ml}$ (tabela 3.23).

Nos implantes teste a deteção e quantificação de DNA ($\mu\text{g/ml}$ de solução) das bactérias totais na S3 foi de $4,3742 \pm 5,9838 \mu\text{g (DNA)/ml}$. Este valor sofreu variação ao longo do procedimento experimental, atingindo o valor máximo na S15 ($8,8167 \pm 12,4425 \mu\text{g (DNA)/ml}$) e na S17 a quantidade total de DNA bacteriano detetado foi de $5,8098 \pm 5,7581 \mu\text{g (DNA)/ml}$ (tabela 3.23).

Tabela 3.23 – Média e desvio padrão da quantidade de DNA ($\mu\text{g/ml}$ de solução) para os grupos implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

		Carga bacteriana – Implantes controlo e implantes teste - (μg (DNA) /ml de solução)					
		S3	S6	S9	S12	S15	S17
B.T.	IC	1,7920 \pm 1,5037	0,6395 \pm 0,2665	1,7453 \pm 1,7403	0,6755 \pm 0,3025	2,1613 \pm 1,4340	0,0556 \pm 0,1262
	IT	4,3742 \pm 5,9838	1,7993 \pm 1,3869	4,2247 \pm 7,7254	2,5417 \pm 2,5731	8,8167 \pm 12,4425	5,8098 \pm 5,7581
<i>Streptococcus spp.</i>	IC	0,2045 \pm 0,0448	0,1326 \pm 0,1028	0,2538 \pm 0,0302	0,000 \pm 0,000	0,1283 \pm 0,0331	0,1066 \pm 0,0576
	IT	0,1636 \pm 0,0422	0,1122 \pm 0,1239	0,1248 \pm 0,1393	0,1225 \pm 0,1457	0,1032 \pm 0,0595	0,1212 \pm 0,0098
<i>Fusobacterium spp.</i>	IC	0,00066 \pm 0,0016	0,00033 \pm 0,00051	0,00302 \pm 0,00302	0,00022 \pm 0,00020	0,00226 \pm 0,00165	0,00016 \pm 0,00025
	IT	0,00898 \pm 0,01268	0,00177 \pm 0,00145	0,00286 \pm 0,00248	0,00761 \pm 0,00404	0,01490 \pm 0,02709	0,00302 \pm 0,00147
<i>Pg</i>	IC	0,00119 \pm 0,00293	0,00208 \pm 0,00240	0,00055 \pm 0,00089	0,00000 \pm 0,00000	0,26368 \pm 0,39255	0,00003 \pm 0,00004
	IT	0,00914 \pm 0,00347	0,01103 \pm 0,00581	0,00176 \pm 0,00271	0,02248 \pm 0,02414	0,32926 \pm 0,49477	3,13697 \pm 5,16191
<i>Aa</i>	IC	0,00000 \pm 0,00000	0,00210 \pm 0,00514	0,00747 \pm 0,00587	0,00000 \pm 0,00000	0,02170 \pm 0,01682	0,00000 \pm 0,00000
	IT	0,00840 \pm 0,00651	0,00820 \pm 0,00990	0,00704 \pm 0,00506	0,01559 \pm 0,00727	0,02290 \pm 0,01790	0,02717 \pm 0,01332
<i>Pi</i>	IC	0,00005 \pm 0,00012	0,00017 \pm 0,00041	0,00008 \pm 0,00013	0,00042 \pm 0,00102	0,00006 \pm 0,00014	0,00064 \pm 0,00156
	IT	0,00028 \pm 0,00047	0,00009 \pm 0,00022	0,00063 \pm 0,00141	0,00118 \pm 0,00277	0,00712 \pm 0,01276	0,00605 \pm 0,01005

Abreviaturas: B.T.: Bactérias totais; *Streptococcus spp.*: *Streptococcus species*; *Fusobacterium spp.*: *Fusobacterium species*; ; *Pg*: *Porphyomonas gingivalis*; *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pi*: *Prevotella intermedia*.

Comparando a totalidade de bactérias presentes nos dois grupos ao longo do período experimental verificou-se que, apesar da carga bacteriana total ter sido sempre superior no grupo implantes teste, apenas existiram diferenças estatisticamente significativas na S12 ($p=0,025$) e S17 ($p=0,004$) (tabela 3.24 e gráfico 8).

Tabela 3.24 – Valor de p relativo à comparação intergrupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável bactérias totais.

Bactérias Totais						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	16.000	6.000	17.000	4.000	11.000	<0.001
Z	-0.320	-1.922	-0.160	-2.242	-1.121	-2.887
valor de p	0,749	0,055	0,873	0,025	0,262	0,004

Abreviaturas: U: Teste *post-hoc* de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p<0.05$).

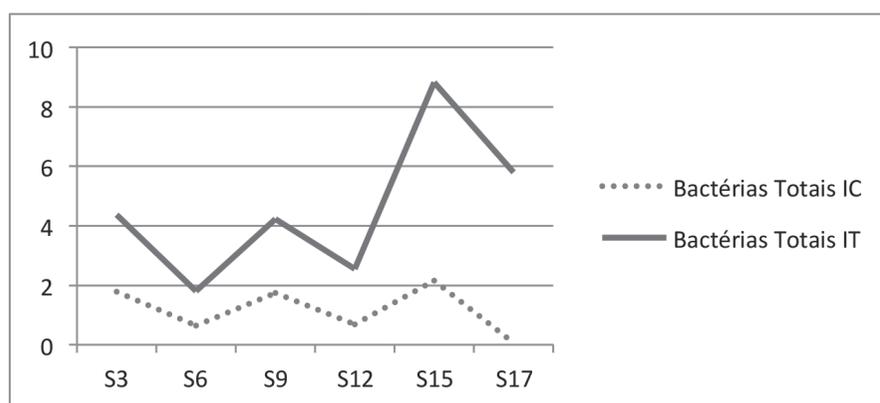


Gráfico 8 – Bactérias totais (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.1.2 – *Streptococcus* species (*Streptococcus spp.*)

Para ambos os grupos, na primeira colheita microbiológica foi detetado *Streptococcus spp.* em todos os 6 cães (anexo – tabela J). Nas restantes colheitas realizadas nos implantes controlo a sua deteção foi oscilando entre a ausência total (S12), parcial (S6 e S17) ou presença em todos os cães (S9 e S15) (anexo – tabela J). A deteção e quantificação de DNA (µg/ml de solução) de *Fusobacterium spp.* na S3 foi de $0,2045 \pm 0,0448$ µg(DNA)/ml. Este valor sofreu variação ao longo do procedimento experimental, atingindo o valor máximo na S9 ($0,2538 \pm 0,0302$ µg (DNA)/ml) e na S12 não foi detetado o seu DNA (tabela 3.23).

Para os implantes teste, nas restantes semanas alguns dos animais não apresentaram DNA desta espécie bacteriana (anexo – tabela J). Relativamente à quantificação do DNA da espécie *Streptococcus spp.* verificou-se que na S3 foi de $0,1636 \pm 0,0422$ (µg (DNA)/ml). Este valor manteve-se relativamente estável ao longo do procedimento experimental e na S17 foi de $0,1212 \pm 0,0098$ µg (DNA)/ml (tabela 3.23).

Relativamente ao *Streptococcus spp.* não foi encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa entre ambos grupos, ao longos das várias semanas (tabela 3.25 e gráfico 9).

Tabela 3.25 – Valor de p relativo à comparação intergrupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável *Streptococcus spp.*

<i>Streptococcus spp.</i>						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	11.000	18.000	8.000	9.000	12.500	17.000
Z	-1.121	<0.001	-1.613	-1.892	-0.885	-0.161
valor de p	0,262	1,000	0,107	0,059	0,376	0,872

Abreviaturas: U: Teste post-hoc de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

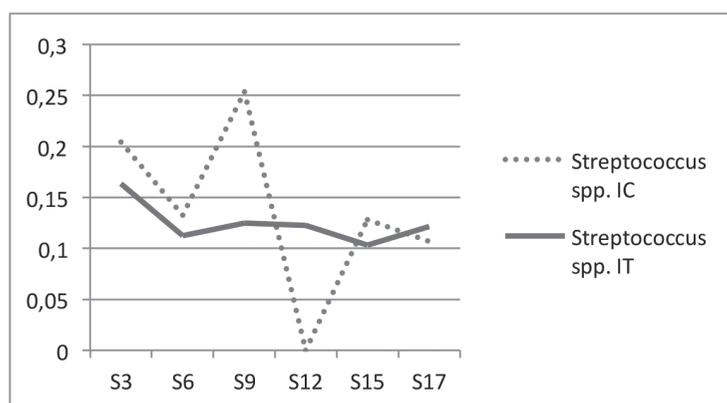


Gráfico 9 – *Streptococcus spp.* (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.1.3 – *Fusobacterium species (Fusobacterium spp.)*

Nos implantes controlo o DNA de *Fusobacterium spp.* esteve presente em todos os tempos de observação (S3 a S17) (tabela 3.23). No entanto, não foi identificado em todos os cães em todas as semanas. Na S3, dos 6 cães analisados apenas em 1 foi detetado o DNA pesquisado. Nas restantes semanas, com exceção da S15, houve sempre um ou mais animais onde não foi detetado este DNA (anexo – tabela L). A deteção e quantificação de DNA (µg/ml de solução) de *Fusobacterium spp.* na S3 foi de $0,00066 \pm 0,0016$ µg(DNA)/ml. Este valor sofreu variação ao longo do procedimento experimental, atingindo o valor máximo na S9 ($0,00302 \pm 0,00302$ µg (DNA)/ml) e na S17 a quantidade total de DNA bacteriano detetado foi de $0,00016 \pm 0,00025$ µg (DNA)/ml (tabela 20).

Nos implantes teste a *Fusobacterium spp.* foi detectada em todos os cães em todos os períodos, com exceção de um cão na S9 (anexo– tabela L). A média da quantidade de DNA detectada nos implantes teste na S3 foi de $0,00898 \pm 0,01268$ µg/ml de solução. Ao longo do período experimental verificou-se uma variação dos valores obtidos atingindo-se na S15 o valor máximo ($0,01490 \pm 0,02709$ µg/ml).

Para a *Fusobacterium spp.*, com exceção da S9, os valores foram sempre mais elevados no grupo implantes teste, embora com diferenças estatisticamente significativas apenas na S3 ($p=0,015$), S6 ($p=0,022$), S12 ($p=0,002$) e S17 ($p=0,003$) (tabela 3.26 e gráfico 10).

Tabela 3.26 – Valor de *p* relativo à comparação intergrupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável *Fusobacterium spp.*

<i>Fusobacterium spp.</i>						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	3.000	4.000	17.500	<0.001	16.000	<0.001
Z	-2.491	-2.282	-0.192	-2.892	-0.320	-2.934
valor de p	0,015	0,022	0,847	0,002	0,749	0,003

Abreviaturas: U: Teste *post-hoc* de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p<0.05$).

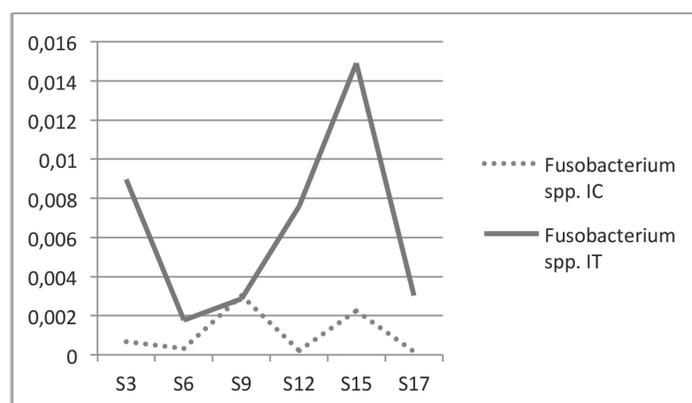


Gráfico 10 – *Fusobacterium spp.* (valor médio de DNA em $\mu\text{g/ml}$ de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.1.4 – *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

Nos implantes controlo, na colheita inicial realizada na S3, foi detectado DNA desta bactéria em apenas 1 dos 6 cães. Em todas as semanas, com exceção da S9, houve pelo menos 1 animal onde não foi detetado DNA desta bactéria. Na última colheita (S17) apenas foi detetada em 4 dos 6 cães (anexo – tabela M). No grupo implantes controlo detectou-se $0,00119 \pm 0,00293 \mu\text{g}$ (DNA)/ml na S3 tendo este valor aumentado ligeiramente na S6 para de seguida decrescer na S9. Na S12 não foi detectado DNA de Pg. e na colheita seguinte (S15) quantificou-se o seu valor máximo ($0,26368 \pm 0,39255 \mu\text{g}$ (DNA)/ml) (tabela 3.23).

Nos implantes teste, com exceção de um cão na S6, o DNA da *Porphyromonas gingivalis* foi detectado em todos os animais e em todos os períodos experimentais. A quantidade de DNA detetada ao longo das semanas foi díspar, atingindo o valor mínimo num dos cães na S9 e o valor máximo noutra animal na S17 (anexo – tabela M). Na S3 foi detectado $0,00914 \pm 0,00347 \mu\text{g}$ (DNA)/ml tendo o seu valor máximo sido atingido na S17 ($3,13697 \pm 5,16191 \mu\text{g}$ (DNA)/ml) (tabela 3.23).

Para a *Porphyromonas gingivalis* encontraram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos IC e IT na S3 ($p=0,008$), S12 ($p=0,003$) e S17 ($p=0,004$) (gráfico 11, tabela 3.27). Nestes casos os IT apresentaram os valores mais elevados.

Tabela 3.27 – Valor de p relativo à comparação inter-grupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável *Porphyromonas gingivalis*.

<i>Porphyromonas gingivalis</i>						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	2.000	4.500	12.000	<0.001	17.000	<0.001
Z	-2.657	-2.205	-0.961	-2.989	-0.160	-2.892
valor de p	0,008	0,27	0,337	0,003	0,873	0,004

Abreviaturas: U: Teste post-hoc de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

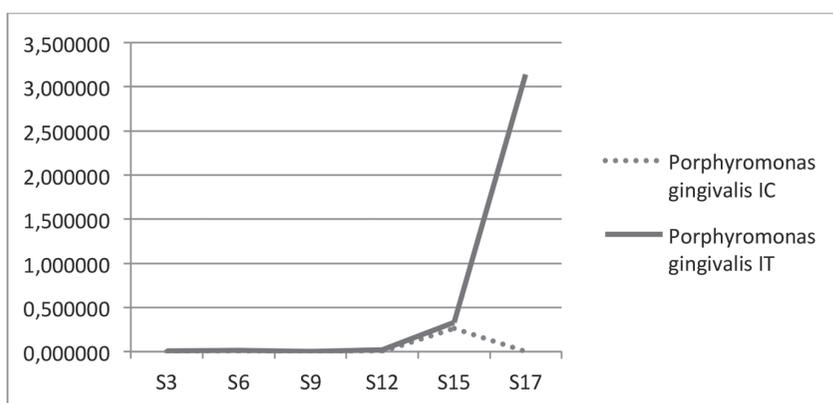


Gráfico 11 – *Porphyromonas gingivalis* (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.1.5 – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)

Nos implantes controlo em nenhum dos 6 cães foi detectado DNA de Aa na S3, o mesmo acontecendo na S12 e S17. Na S6 apenas foi detectado em 1 dos animais e na S9 e S15 em 4 deles (anexo – tabela N). O valor máximo de DNA foi detectado na S15 ($0,02170 \pm 0,01682$ µg (DNA)/ml).

Nas colheitas realizadas para detetar DNA nos implantes teste verificou-se que apenas na S12 a totalidade dos animais obtiveram resultados positivos. Nas restantes semanas houve sempre um ou mais animais onde não foi detetado aquele DNA (anexo – tabela N). Avaliando a quantificação de DNA de Aa, para os implantes teste, verificou-se que nas três primeiras avaliações (S3, S6 e S9) o seu valor foi relativamente constante ($0,00840 \pm 0,00651$, $0,00820 \pm 0,00990$ e $0,00704 \pm 0,00506$ µg (DNA)/ml, respetivamente). Este valor foi sofrendo um aumento ao longo do procedimento experimental obtendo-se o valor mais elevado ($0,027 \pm 0,013$ µg (DNA)/ml) na última semana (S17) (tabela 3.23).

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a Aa, entre os IC e os IT na S3 ($p=0,019$), S12 ($p=0,002$) e S17 ($p=0,006$), sempre com valores mais elevados no grupo IT (tabela 3.28 e gráfico 12).

Tabela 3.28 – Valor de p relativo à comparação inter-grupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	6.000	11.500	15.000	<0.001	16.000	3.000
Z	-2.345	-1.251	-0.487	-3.077	-0.339	-2.739
valor de p	0,019	0,211	0,626	0,002	0,735	0,006

Abreviaturas: U: Teste *post-hoc* de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

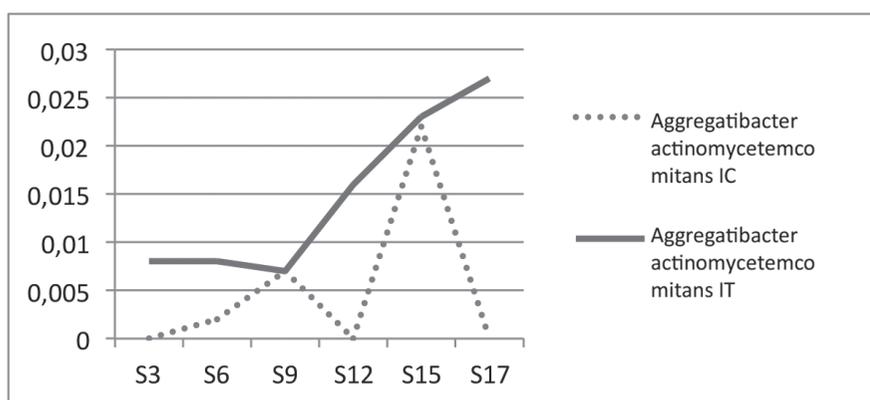


Gráfico 12 – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (valor médio de DNA em $\mu\text{g/ml}$ de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.1.6 – *Prevotella intermedia* (Pi)

Para o grupo implantes controlo o DNA da *Pi* foi detectada em todos os tempos experimentais (tabela 3.23). Contudo, com exceção da S9 onde foi detetado em 2 dos 6 cães, nos restantes períodos apenas foi detetado num animal (anexo – tabela O). Na S3 e S15 foram detetadas as menores quantidades de DNA, $0,00005 \pm 0,00012$ e $0,00006 \pm 0,00014$ μg (DNA)/ml, respectivamente.

No que concerne ao grupo implantes teste o DNA de *Prevotella intermedia* na S3, S9, S12, S15 e S17 foi detetado em 2 dos 6 cães, enquanto que na S6 apenas foi detetado em 1 dos 3 cães (anexo – tabela O). A quantidade de DNA detetada nos implantes teste, na S3, foi $0,00028 \pm 0,00047$ μg (DNA)/ml. A sua quantificação atingiu o pico na S15 ($0,0071 \pm 0,01276$ μg (DNA)/ml.) e na última avaliação, na S17, a quantidade detetada foi de $0,00605 \pm 0,01005$ μg (DNA)/ml (tabela 3.23).

Para a *Prevotella intermedia* não se encontrou qualquer diferença estatisticamente significativa, entre os IC e IT ao longo do procedimento experimental (tabela 3.29 e gráfico 13).

Tabela 3.29 – Valor de p relativo à comparação inter-grupos (implantes controlo vs implantes teste) para a variável *Prevotella intermedia*.

<i>Prevotella intermedia</i>						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	14.000	17.500	17.000	15.000	14.000	14.000
Z	-0.841	-0.123	-0.192	-0.631	-0.841	-0.841
valor de p	0,400	0,902	0,847	0,528	0,400	0,400

Abreviaturas: U: Teste *post-hoc* de Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

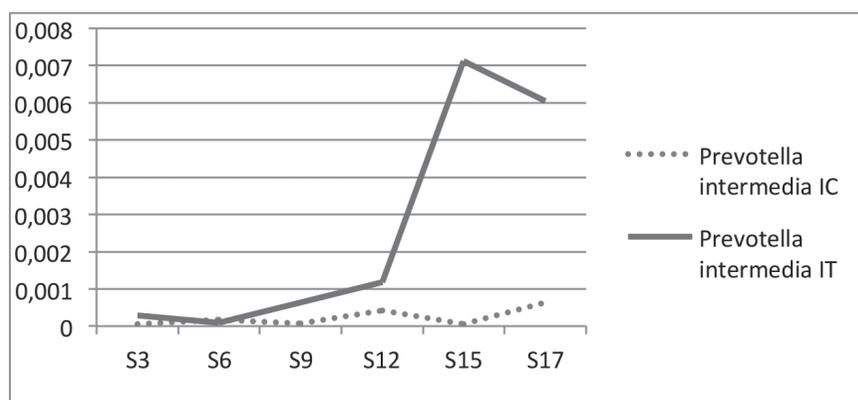


Gráfico 13 – *Prevotella intermedia* (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.

3.6.2 – Resultados intragrupos

3.6.2.1 – Bactérias totais

A quantificação das bactérias totais nos implantes controle colocados na posição do 1º molar (IC-₁M₁) aumentou ligeiramente entre a primeira (S3) e a última colheita (S15) (gráfico 14A), não sendo a diferença entre ambas estatisticamente significativa ($Z=-0,314$; $p=0,753$).

Para o mesmo grupo de implantes colocados na posição do 4º pré-molar (IC-₄PM₄) verificou-se a existência de uma diminuição da sua quantificação entre a primeira (S6) e a última (S17) colheita (gráfico 14B), sendo essa variação estatisticamente significativa ($Z=-2,201$; $p=0,028$).

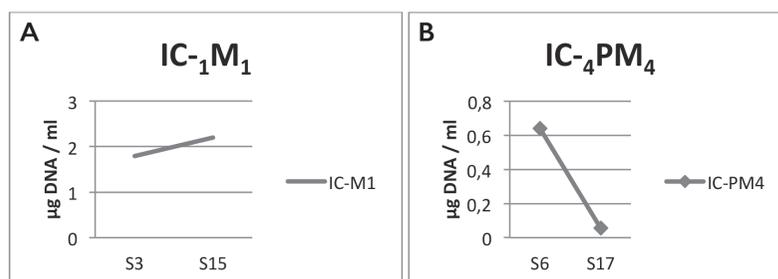


Gráfico 14 – Média de DNA (µg(DNA)/ml) de bactérias totais no grupo implantes controle colocados na posição do 1º molar (IC-₁M₁) (A) e 4º pré-molar (IC-₄PM₄) (B).

Para os implantes teste a quantificação do DNA das bactérias totais nos IT-₁M₁ aumentou da S3 para a S15, observando-se um padrão semelhante para os IT-₄PM₄ (gráfico 15). As variações detectadas para os IT-₁M₁ não se revelaram estatisticamente significativas ($Z=-0,105$; $p=0,915$), o mesmo ocorrendo para os IT-₄PM₄ ($Z=-1,753$; $p=0,080$).

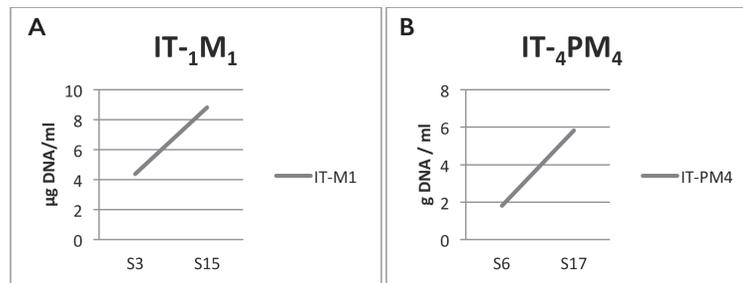


Gráfico 15 – Média de DNA ($\mu\text{g(DNA)/ml}$) de bactérias totais no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar (IC_{-1}M_1) (A) e 4º pré-molar ($\text{IC}_{-4}\text{PM}_4$) (B).

3.6.2.2 – *Streptococcus* species

Relativamente à quantificação desta espécie nos implantes controlo colocados na posição IC_{-1}M_1 verificou-se que houve uma diminuição entre S3 e S15, sendo a mesma estatisticamente significativa ($Z=-2.201$; $p=0,028$) (gráfico 16A). Nos $\text{IC}_{-4}\text{PM}_4$ a quantidade de DNA detectado diminuiu entre S6 e S17. No entanto não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre elas ($Z=-0.315$; $p=0,752$) (gráfico 16B).

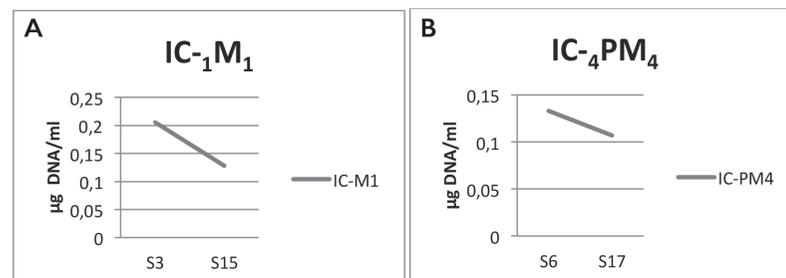


Gráfico 16 – Média de DNA ($\mu\text{g(DNA)/ml}$) de *Streptococcus species* no grupo implantes controlo colocados na posição do 1º molar (IC_{-1}M_1) (A) e 4º pré-molar ($\text{IC}_{-4}\text{PM}_4$) (B).

Nos implantes teste a quantificação de *Streptococcus spp.* presente nos IT_{-1}M_1 revelou uma diminuição entre S3 e S15, enquanto que nos $\text{IT}_{-4}\text{PM}_4$ aumentou entre a S6 e a S17 (gráfico 17A e B). Estas variações não foram estatisticamente significativas quer para os IT_{-1}M_1 ($Z=-1.367$; $p=0,172$) quer para os $\text{IT}_{-4}\text{PM}_4$ ($Z=-0.314$; $p=0,753$).

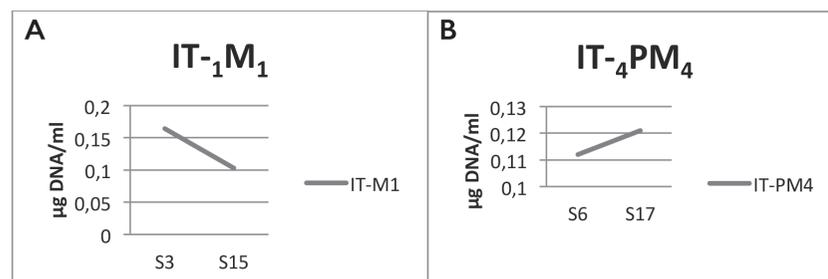


Gráfico 17 – Média de DNA ($\mu\text{g(DNA)/ml}$) de *Streptococcus species* no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar (IC_{-1}M_1) (A) e 4º pré-molar ($\text{IC}_{-4}\text{PM}_4$) (B).

3.6.2.3 – *Fusobacterium* species

Nos implantes controlo a quantificação do DNA realizada nos IC-₁M₁ aumentou da S3 para a S15 (gráfico 18A), sem que no entanto se verificassem diferenças estatisticamente significativas entre ambas colheitas ($Z=-1.782$; $p=0,075$). Para os IC-₄PM₄ a sua quantificação diminuiu entre a colheita inicial e a final (S6 e S17) (gráfico 18B), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre ambas ($Z=-1.069$; $p=0,285$).

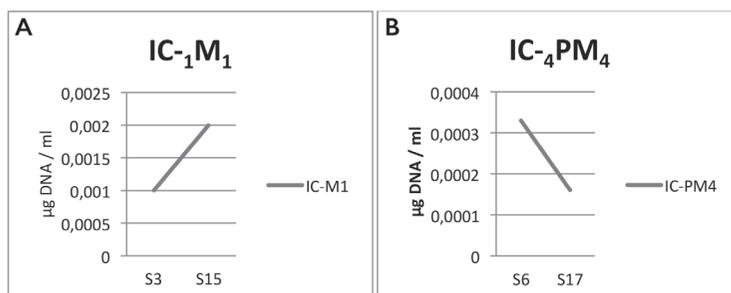


Gráfico 18 – Média de DNA ($\mu\text{g(DNA)/ml}$) de *Fusobacterium* species no grupo implantes controlo colocados na posição do 1º molar (IC-₁M₁) (A) e 4º pré-molar (IC-₄PM₄) (B).

Para os implantes teste a quantificação do DNA quer nos IT-₁M₁ quer nos IT-₄PM₄ aumentou ligeiramente entre ambas colheitas (gráfico 19A e B).

As variações detectadas, para os IT-₁M₁ não se revelaram estatisticamente significativas ($Z=-0.105$; $p=0,917$), o mesmo acontecendo para os IT-₄PM₄ ($Z=-1.782$; $p=0,075$).

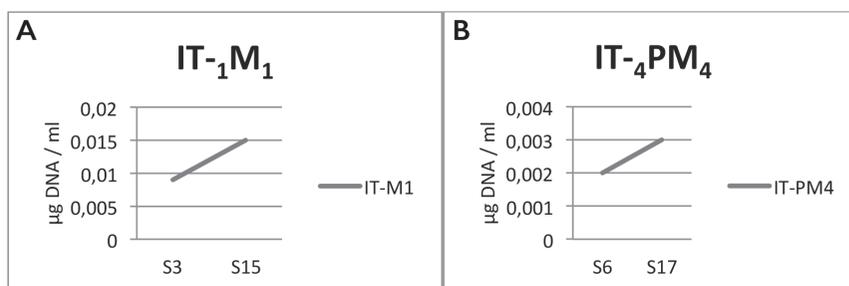


Gráfico 19 – Média de DNA ($\mu\text{g(DNA)/ml}$) de *Fusobacterium* spp. no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar (IC-₁M₁) (A) e 4º pré-molar (IC-₄PM₄) (B).

3.6.2.4 – *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

Relativamente ao grupo implantes controlo colocados na posição IC-₁M₁ verificou-se um aumento da quantificação do seu DNA entre a primeira (S3) e a última (S15) colheita (gráfico 20A), tendo este aumento apresentado uma variação estatisticamente significativa entre S3 e S15 ($Z=-2.023$; $p=0,043$).

A nível dos IC-₄PM₄ houve uma diminuição da quantidade de DNA entre S6 e S17 (gráfico 20B), sem que tenha ocorrido uma variação estatisticamente significativa entre ambas semanas ($Z= -0.946$; $p=0,344$).

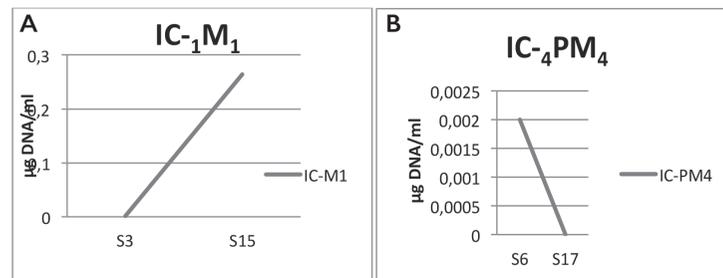


Gráfico 20 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Porphyromonas gingivalis* no grupo implantes controlo colocados na posição do 4º pré-molar (IC-4PM₄) (A) e colocados na opção do 1º molar (IC-1M₁) (B).

No que concerne à sua quantificação nos IT-M₁, o valor aumentou entre S3 e S15 (gráfico 21A), não sendo esta variação estatisticamente significativa entre ambas avaliações ($Z=-1.572$; $p=0,116$).

Relativamente aos IT-4PM₄ a sua quantificação aumentou entre S6 e S17 (gráfico 21B), mas não de forma estatisticamente significativa entre as semanas ($Z=-1.572$; $p=0,116$).

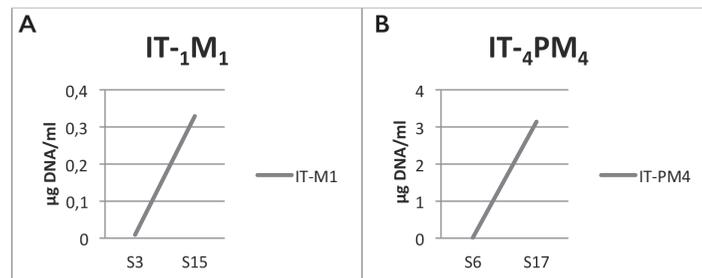


Gráfico 21 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Porphyromonas gingivalis* no grupo implantes teste colocados na posição do 4º pré-molar (IT-4PM₄) (A) e colocados na opção do 1º molar (IT-1M₁) (B).

3.6.2.5 – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)

Para o grupo implantes controlo, no que concerne à quantificação de DNA nos IC-1M₁ não foi detetada na primeira colheita (S3), tendo sido detetada na última (S15) (gráfico 22A). No entanto, esta variação não foi estatisticamente significativa ($Z=-1.841$; $p=0,066$) ao longo das semanas.

Relativamente à sua deteção nos IC-4PM₄ apenas foi detetada na primeira colheita (S6) mas não na última (S17) (gráfico 22B). Após análise da variação da Aa verificou-se que não apresentou uma variação estatisticamente significativa entre ambas colheitas (S6 e S17) ($Z=-1.000$; $p=0,317$).

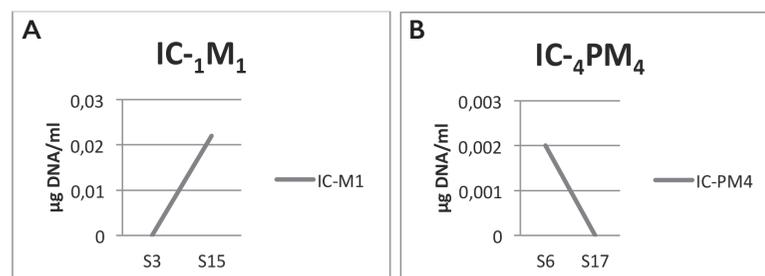


Gráfico 22 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no grupo implantes controlo colocados na posição do 4º pré-molar (IC-4PM₄) (A) e colocados na opção do 1º molar (IC-1M₁) (B).

Avaliando a quantificação de DNA de *Aa* quer nos IT-₁M₁ quer nos IT-₄PM₄ houve um aumento entre ambas colheitas (gráfico 23A e B). No entanto, enquanto que para os IT-₁M₁ este aumento não foi estatisticamente significativo ($Z=-1.786$; $p=0,074$) para os IT-₄PM₄ o mesmo já apresentou uma variação estatisticamente significativa ($Z=-2.041$; $p=0,041$).

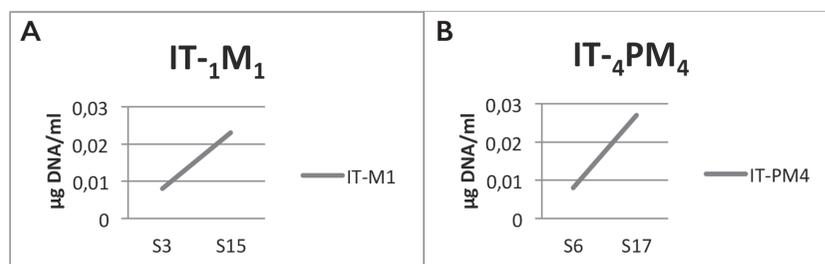


Gráfico 23 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no grupo implantes teste colocados na posição do 4° pré-molar (IC-₄PM₄) (A) e colocados na posição do 1° molar (IC-₁M₁) (B).

3.6.2.6 – *Prevotella intermedia* (Pi)

Relativamente à quantificação desta espécie nos IC-₁M₁ houve um aumento entre S3 e S15, não sendo o mesmo estatisticamente significativo ($Z=-1.000$; $p=0,317$) (gráfico 24A).

Nos IC-₄PM₄ a quantidade de DNA detectado aumentou entre S6 e S17, mas não de forma estatisticamente significativa ($Z=-0.447$; $p=0,655$) (gráfico 24B).

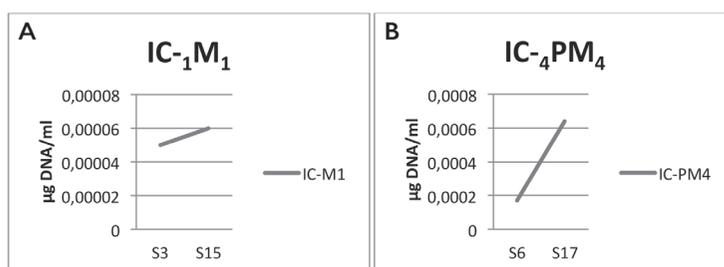


Gráfico 24 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Prevotella intermedia* no grupo implantes controlo colocados na posição do 4° pré-molar (IC-₄PM₄) (A) e colocados na posição do 1° molar (IC-₁M₁) (B).

No que concerne aos IT-₁M₁ verificou-se haver um aumento da quantidade de DNA entre a S3 e a S15, não tendo este aumento sido estatisticamente significativo ($Z=-1.069$; $p=0,285$) (gráfico 25A).

Para os IT-₄PM₄ verificou-se um aumento da quantidade de DNA detectado entre ambas colheitas (S6 e S17) (gráfico 25B), no entanto, sem variação estatisticamente significativa ($Z=-1.069$; $p=0,285$).

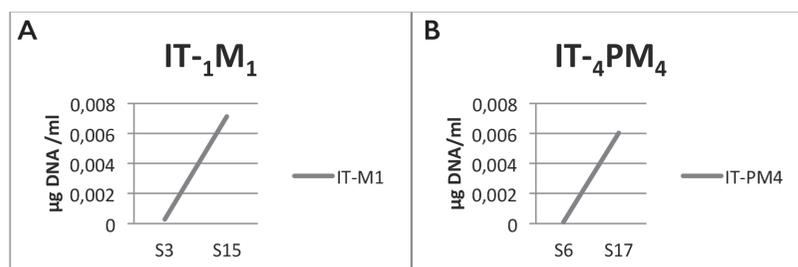


Gráfico 25 – Média de DNA ($\mu\text{g}(\text{DNA})/\text{ml}$) de *Prevotella intermedia* no grupo implantes teste colocados na posição do 4° pré-molar (IC-₄PM₄) (A) e colocados na posição do 1° molar (IC-₁M₁) (B).

3.7 – Avaliação histológica

3.7.1 – Avaliação histológica qualitativa

Considerando que os elementos constituintes das estruturas imediatamente adjacentes aos implantes apresentam muitas características topográficas e histológicas em comum com o periodonto que circunda o dente, mantivemos nos resultados obtidos para os implantes controlo e teste as mesmas designações utilizadas para o dente. Esta região, constituindo uma barreira biológica protetora, é formada pelo epitélio oral da gengiva (EOG), epitélio sulcular (ES) e epitélio juncional (EJ), bem como pelo tecido conjuntivo localizado entre o tecido epitelial e o tecido ósseo marginal.

3.7.1.1 – Grupo implantes controlo

– Epitélio oral da gengiva

A morfologia do epitélio oral da gengiva (EOG), também chamado epitélio da gengiva livre ou marginal, pode diferir entre os cortes vestibular / lingual e os cortes mesio-distais. Nos primeiros, este epitélio apresenta uma forma mais pontiaguda, semelhante a uma faca, muitas vezes descrita como *knife-edge* (Fig. 3.27). Por sua vez, nos cortes mesio-distais apresentou-se em forma de barriga, descrita como *belly-shape*.

O epitélio da gengiva livre ou marginal apresentou-se frequentemente como um epitélio paraqueratinizado (Figs. 3.27 e 3.28) em que as células mais superficiais mostram a presença de um núcleo picnótico e achatado, não sendo possível detetar nenhum estrato córneo nem granuloso (Fig. 3.28).

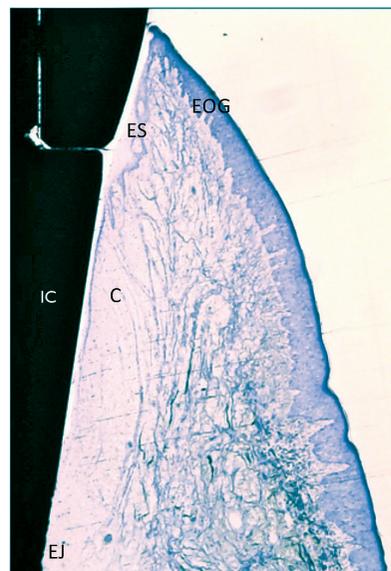


Figura 3.27 – Imagem em microscopia de luz de um corte histológico da face vestibular de um implante controlo permitindo observar a localização e organização do epitélio oral da gengiva livre (EOG), epitélio sulcular (ES) e epitélio juncional (EJ) bem como do córion (C) adjacente. 20X no original. Implante Controlo (IC) (AT).

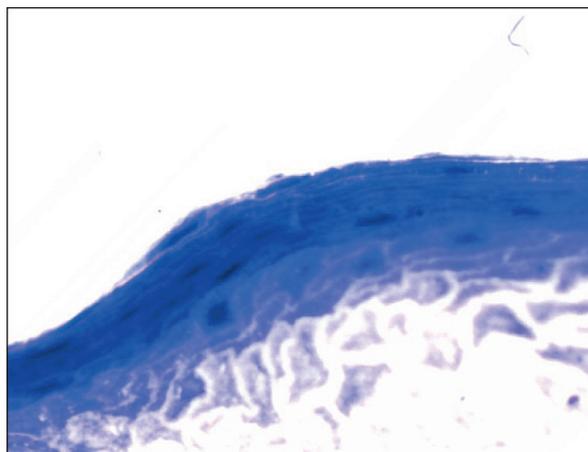


Figura 3.28 – Constituição histológica de uma área do epitélio oral da gengiva de um implante controlo, mostrando um epitélio paraqueratinizado. 1000X no original (AT).

A superfície deste epitélio, bem como a do pilar de cicatrização adjacente encontra-se, por norma, livre de placa bacteriana. Na interface entre o epitélio da gengiva livre e o tecido conjuntivo subjacente foi possível detetar a presença de *Rete Pegs* (Fig. 3.27).

– Epitélio sulcular

O epitélio sulcular ou epitélio do sulco (ES) apresenta-se como um epitélio não-queratinizado, que se continua coronalmente com o epitélio oral da gengiva e apicalmente com o epitélio juncional (Figs. 3.29 e 3.30), revestindo um espaço que o separa da superfície do implante designado por sulco peri-implantar. Nalguns cortes histológicos foi possível observar a presença de PB neste sulco. Não foi possível observar a presença de cálculos em contacto com este epitélio.

Por outro lado foi possível observar entre as células epiteliais a existência de algumas células de aparente natureza inflamatória (Fig. 3.31).

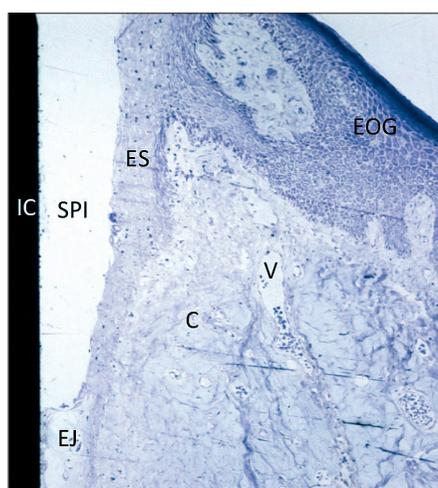


Figura 3.29 –Margem gengival (vestibular) de implante controlo (IC). Destaca-se o sulco peri-implantar (SPI) delimitado pelo epitélio sulcular e do epitélio juncional. No seio do córion (C) é possível observar vasos sanguíneos (V). 40 X no original (AT).

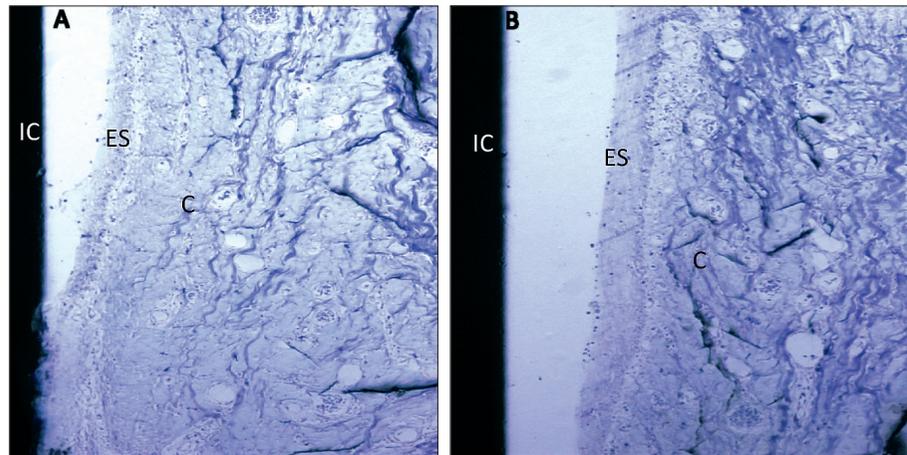


Figura 3.30 – Imagens semelhantes à da figura anterior, em maior ampliação, mostrando algumas características do epitélio sulcular e do corion a ele associado. 100X no original (AT).

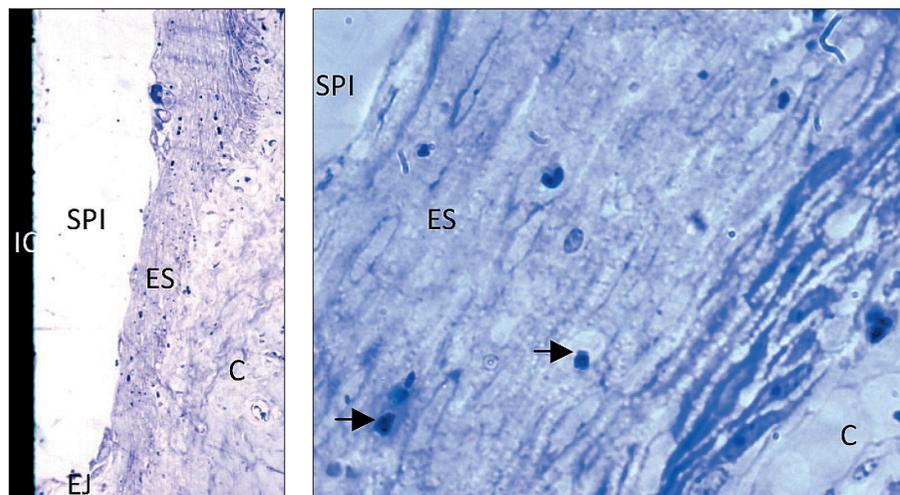


Figura 3.31 – Pormenor do epitélio sulcular destacando-se a presença de algumas células inflamatórias (setas) entre as células epiteliais. (A) 200X no original. (B) 1000X no original (AT).

O córion adjacente ao epitélio sulcular apresentou-se formado por um tecido conjuntivo laxo com escasso número de fibroblastos e de fibras de colagénio, que lhe são característicos, bem como algumas células inflamatórias.

– Epitélio juncional

Os implantes controlo apresentam um epitélio juncional constituído por várias camadas celulares com o seu eixo maior paralelo ao eixo maior do implante (Figs. 3.32 e 3.33). O número de camadas epiteliais diminui de coronal para apical.

Tendo em atenção o volume de tecido, as células que constituem o epitélio juncional são maiores que as que constituem o epitélio sulcular e o epitélio gengival. Da mesma forma, o espaço intercelular no epitélio juncional, relativamente ao volume tecidual, é comparativamente maior do que no epitélio gengival.

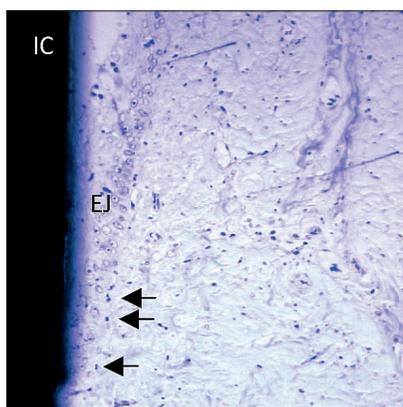


Figura 3.32 – Aspeto da localização e organização do epitélio juncional relativamente a um implante controle, onde são visíveis células com características inflamatórias aparentes (setas). 200X no original (AT).

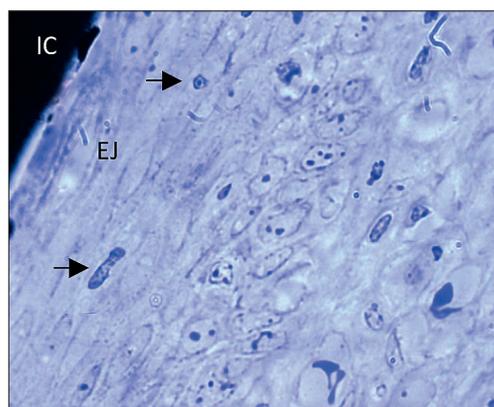


Figura 3.33 – Pormenor do epitélio juncional pondo em evidência as características histológicas deste epitélio e a sua íntima justaposição ao implante controle bem como a presença de células com características inflamatórias (setas). 1000X no original (AT).

A camada mais superficial deste epitélio evidenciou células alongadas com núcleo picnótico, também alongado, acompanhando a forma da célula. As células mais basais apresentam-se com cromatina pouco condensada e nucléolos muito evidentes (Fig. 3.33). Este epitélio não apresentou *Rete Pegs* epiteliais, o que é característico da ausência de inflamação. De referir ainda que a interface entre este epitélio e o tecido conjuntivo adjacente se apresentou praticamente rectilínea. Contudo, foi possível detetar a presença de algumas células com perfil inflamatório (Fig. 3.33) bem como no tecido conjuntivo adjacente (Figs. 3.32 e 3.33). Os vasos sanguíneos mostraram-se pouco proeminentes considerando o seu número e o seu calibre (Fig. 3.34).

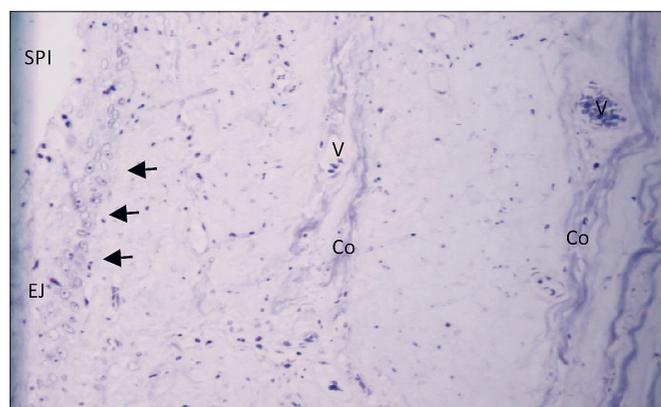


Figura 3.34 – Imagem do tecido conjuntivo associado a uma área do epitélio juncional, evidenciando uma interface epitélio-córcion bastante rectilínea (setas), fibras de colagénio (Co) afastadas da superfície do implante e poucos vasos sanguíneos. Sulco peri-implantar (SPI). 200X no original (AT).

As fibras de colagénio observadas nesta região apresentam-se com uma direcção paralela à superfície do implante ainda que não organizadas em feixes densos. (Fig. 3.34).

A presença de PB não foi tão visível como a que se observou no epitélio sulcular, principalmente na porção mais apical do epitélio juncional.

Tal como aconteceu no epitélio sulcular também no epitélio juncional não foi possível detetar cálculos em contacto com o mesmo. Da mesma forma o epitélio juncional não apresentou zonas ulceradas.

– Tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional

A região compreendida entre a parte mais apical do epitélio juncional e o aparecimento de tecido ósseo apresentou-se constituída por um tecido conjuntivo com fibras de colagénio, presença de fibroblastos e escasso número de vasos sanguíneos (Fig. 3.35).

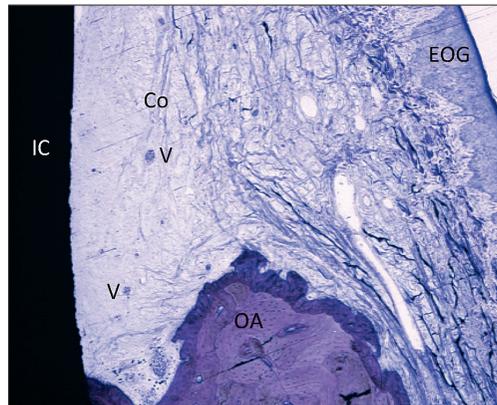


Figura 3.35 – Imagem da constituição histológica da região situada entre a parte mais apical do epitélio juncional e o tecido ósseo marginal, mostrando algumas fibras de colagénio (Co) e escasso número de vasos sanguíneos (V). Osso alveolar (OA). 40X no original (AT).

A maioria das fibras de colagénio observadas não contactavam diretamente com a superfície do implante apresentando uma orientação paralela ao mesmo, não se observando um processo de inserção semelhante ao que se verifica no dente. Foram no entanto visíveis algumas fibras de colagénio com uma orientação oblíqua em relação à superfície do implante, sendo que na zona mais próxima da crista óssea aparentavam unir-se à sua superfície (Fig. 3.36). A maioria destas fibras não se encontra imediatamente adjacente à superfície do implante mas sim mais afastadas da mesma.

É também importante salientar nesta região a quase total ausência de células com características compatíveis com as de um infiltrado inflamatório, sendo este aspeto uma característica observada em quase todas as lâminas.

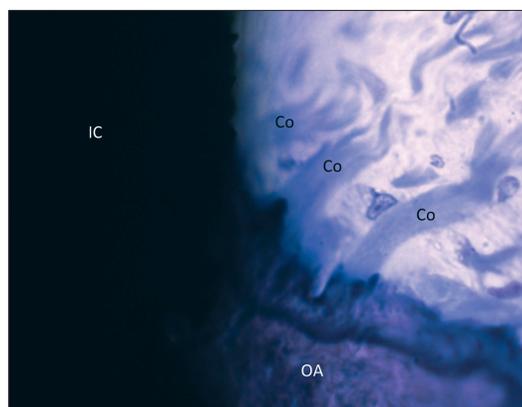


Figura 3.36 – Pormenor da área de contacto mais coronal osso-implante destacando-se a inserção de fibras de colagénio ao osso alveolar (OA) e quase total ausência de infiltrado inflamatório. 1000X no original (AT).

– Tecido ósseo

A observação das lâminas histológicas permite verificar que o tecido ósseo constituinte da crista alveolar contacta diretamente com a superfície dos implantes, estabelecendo um contacto aparentemente íntimo com a mesma (Fig. 3.37).

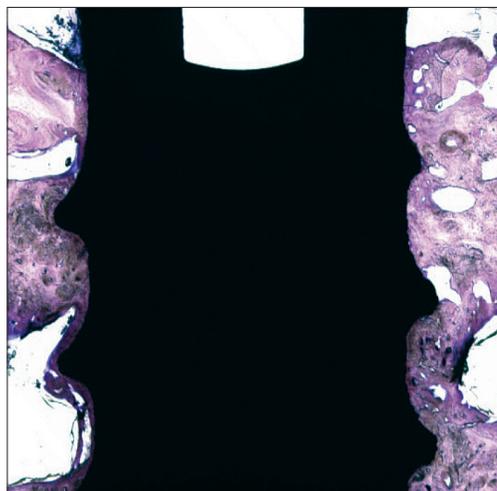


Figura 3.37 – Aspeto da localização, organização e áreas de contacto do tecido ósseo em relação a um implante controlo. 20X no original (AT).

É importante notar também que não foi detetada a presença de tecido fibroso na interface tecido ósseo/implante sendo visível um contacto íntimo entre ambos, (Fig. 3.37) característico da osteointegração implantar.

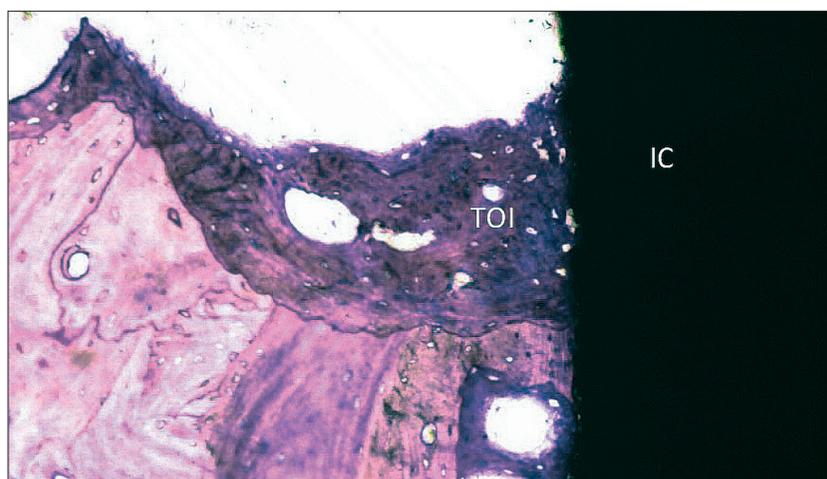


Figura 3.38 – Pormenor de área de tecido ósseo imaturo (TOI), correspondente ao contacto mais coronal osso-implante de um implante controlo. 200X no original (AT).

De registar ainda a existência de algumas zonas de tecido ósseo imaturo particularmente evidentes na crista óssea alveolar (Fig. 3.38) e em certas zonas adjacentes ao corpo do implante, caracterizado por uma grande densidade de osteócitos arredondados e por uma disposição bastante anárquica das fibras de colagénio. Estas áreas são rapidamente alvo de uma atividade osteoclástica, sendo remodeladas e substituídas por tecido ósseo lamelar (Fig. 3.39), sendo este último o mais preponderante.

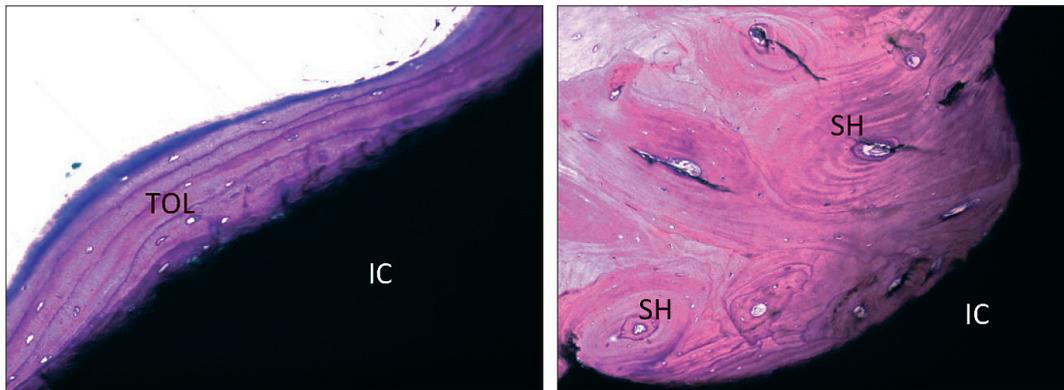


Figura 3.39 – Presença de grande quantidade de tecido ósseo lamelar (TOL) em íntimo contacto com um implante controlo (IC), mostrando uma adequada osteointegração do seu terço médio. De notar ainda a existência de grande número de sistemas de Havers (SH). 200X no original (A). 100X no original (B) (AT).

A presença de tecido ósseo imaturo, embora diminuta, pode ser observada em certas zonas específicas como as regiões de contacto com a superfície do implante, mais propriamente no espaço existente entre duas espiras (Fig. 3.40) bem como na crista óssea coronal (Fig. 3.38).

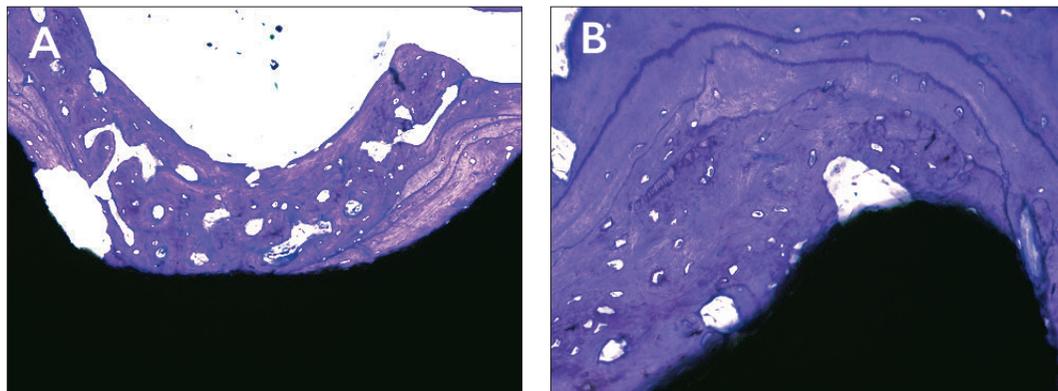


Figura 3.40 – Imagem de algumas regiões de tecido ósseo imaturo detectadas no espaço existente entre duas espiras (A) e a nível de uma espira (B). 100X no original (A). 200X no original (B) (AT).

De registar ainda a presença frequente de *cutting/filling cones* (zonas de reabsorção-formação óssea) (Fig. 3.41). Estas estruturas formam no tecido ósseo verdadeiros túneis/cones de reabsorção que serão prontamente, ainda que lentamente, preenchidos por novo osso traduzindo a grande vitalidade de remodelação óssea que constitui uma resposta ao trauma e às novas condições mecânicas.

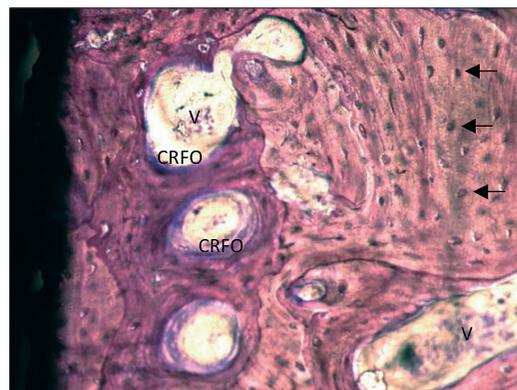


Figura 3.41 – Aspeto de um cone de reabsorção e formação óssea (CFRO) reflectindo um processo de remodelação em actividade. Osteócitos (setas). 200X no original (AT).

O conjunto de células responsáveis por estas atividades reúne uma equipa de células osteoclásticas e de células osteoblásticas. Neste âmbito foi possível observar células osteoclásticas num processo de reabsorção óssea e um grande número de células osteoblásticas à superfície de áreas de matriz osteóide bem como a sua diferenciação em osteócitos (Fig. 3.42).

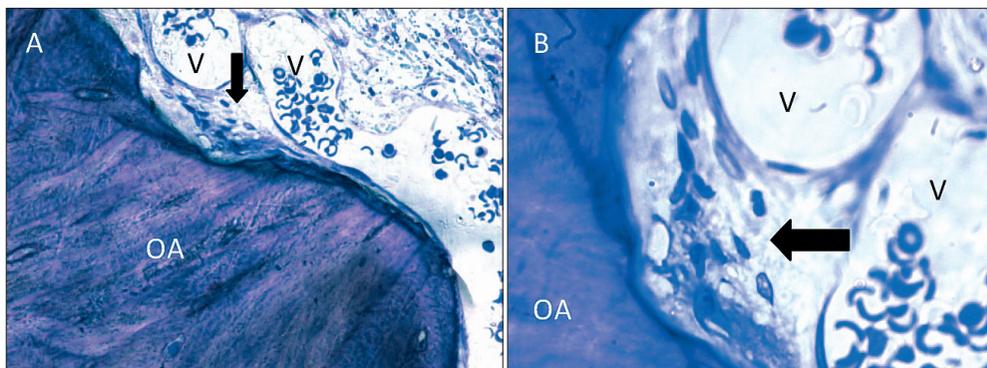


Figura 3.42 – Pormenor de uma aparente célula osteoclástica localizada numa lacuna de Howship presente numa superfície óssea da crista óssea alvéolar (OA). (A). 200X no original. Maior ampliação (B) de uma zona representada na figura anterior permitindo observar com mais pormenor as características de um osteoclasto. (seta). 1000X no original (AT).

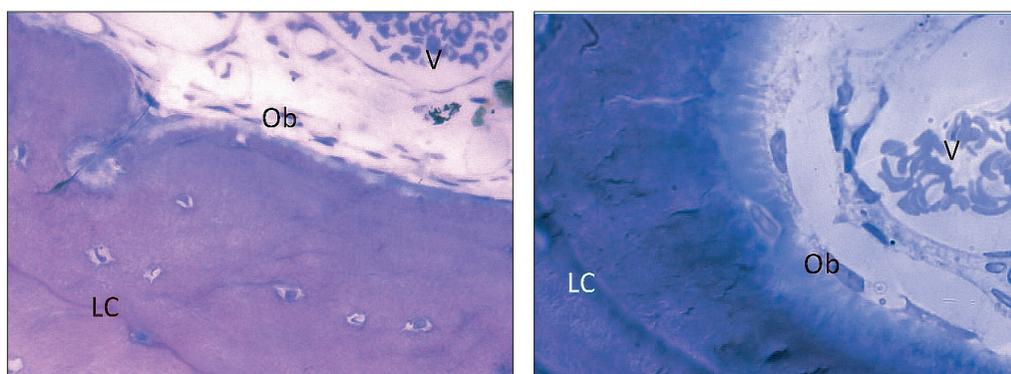


Figura 3.43 – Grande número de células osteoblásticas (Ob) localizadas numa área de formação óssea (A). 200X no original. Presença de células osteoblásticas situadas à superfície de uma zona de matriz osteóide, num processo de osteogénese (B) Linhas cimentantes (LC). 1000X no original (AT).

Nesta perspetiva é também notória a existência de linhas cimentantes que definem uma nítida fronteira entre áreas de tecido ósseo formadas por diferentes gerações de osteoblastos (Fig. 3.43). De facto é nítida a existência de linhas de demarcação entre o tecido ósseo nativo e o tecido ósseo de formação recente, sendo possível notar as suas diferentes características histológicas (Figs. 3.44A e B).

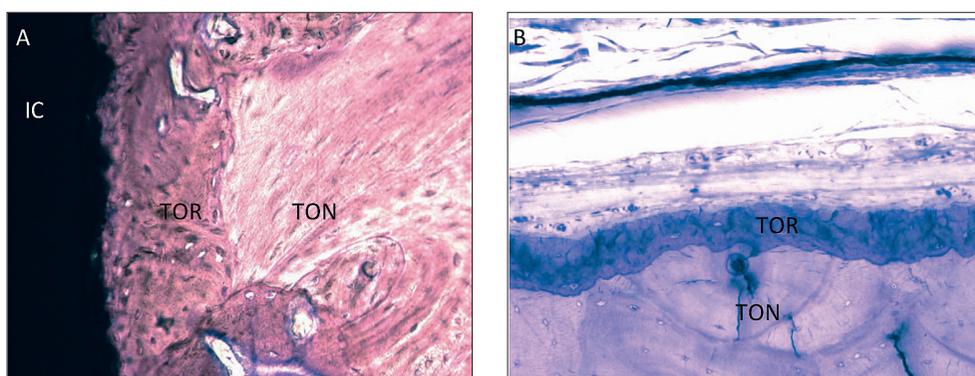


Figura 3.44 – Existência de uma nítida linha de demarcação entre o tecido ósseo nativo (TON) e o tecido ósseo de formação recente (TOR), a nível do terço coronal do implante (A). Presença de um reforço de tecido ósseo marginal neoformado no implante controlo (B). 200X no original (AT).

Em síntese pode-se afirmar que, para o grupo controlo, no final do período experimental os elementos normalmente constituintes dos tecidos peri-implantares, nomeadamente o epitélio gengival, o epitélio sulcular e o epitélio juncional bem como o córion a eles associado apresenta características e organização histológicas idênticas ao observado em situações fisiológicas. De igual modo o tecido conjuntivo localizado entre o tecido epitelial atrás referido e o tecido ósseo marginal mostra um padrão estrutural que não difere do normalmente descrito. Por fim, o tecido ósseo que estabelece a interface com o implante apresentou um grande número de áreas de tecido neoformado em contacto com o implante, reflectindo uma boa osteointegração, bem como uma dinâmica de remodelação característica de tecido ósseo com grande vitalidade.

3.7.1.2 – Grupo implantes teste

– Epitélio oral da gengiva

A organização estrutural do epitélio oral da gengiva (EOG) foi semelhante à encontrada nos implantes controlo. Porém à superfície deste epitélio, bem como a nível do pilar de cicatrização adjacente, observou-se com frequência a presença de um acentuado infiltrado inflamatório e de placa bacteriana. Este infiltrado inflamatório é responsável, em certas zonas, pela perda da integridade deste epitélio e do córion a ele associado, com destruição das Rete Pegs. (Fig. 3.45).

Adicionalmente foram encontrados, nalguns cortes histológicos, placa bacteriana e cálculos (Fig. 3.46A e B) sobre a superfície do pilar de cicatrização, o que não se verificou no grupo de implantes controlo.

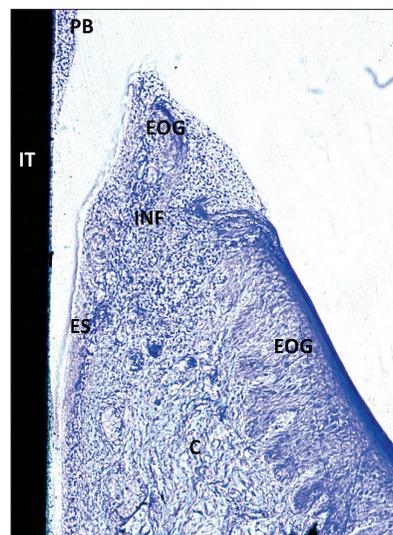


Figura 3.45 – Presença de uma acentuado infiltrado inflamatório (INF), provocando uma desorganização do córion e perda da integridade do epitélio associado observado a nível da gengiva livre de um implante teste (IT). 20X no original (AT).

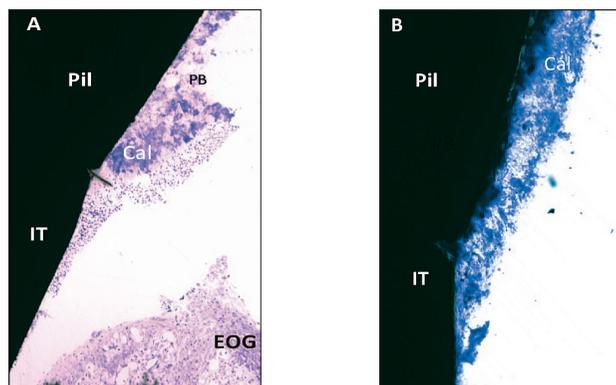


Figura 3.46 – Presença de placa bacteriana (PB) e cálculos (Cal) na superfície do pilar transmucoso (Pil) bem como no implante teste. (A) 100X no original. (B) 200x no original (AT).

Em grandes ampliações foi possível observar com frequência, nas camadas mais superficiais do EOG, fenômenos típicos de edema celular e a existência de células com perfil inflamatório entre as células epiteliais (Fig. 3.47) provocando uma destruição e desorganização das camadas celulares a este nível.

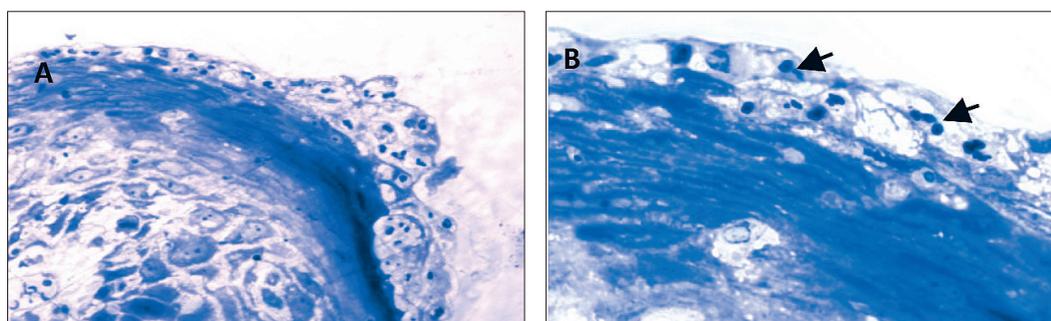


Figura 3.47 – Pormenor do epitélio oral da gengiva sendo visível a presença de fenômenos de edema celular e de células inflamatórias (seta), frequentemente observadas no epitélio gengival de implantes teste. (A) 400X no original. (B) 1000X no original (AT).

No tecido conjuntivo subjacente foi notório um aumento do número e do calibre dos vasos sanguíneos presentes sendo visível a existência de um forte infiltrado inflamatório onde se podem identificar numerosos linfócitos e plasmócitos (Fig. 3.48).

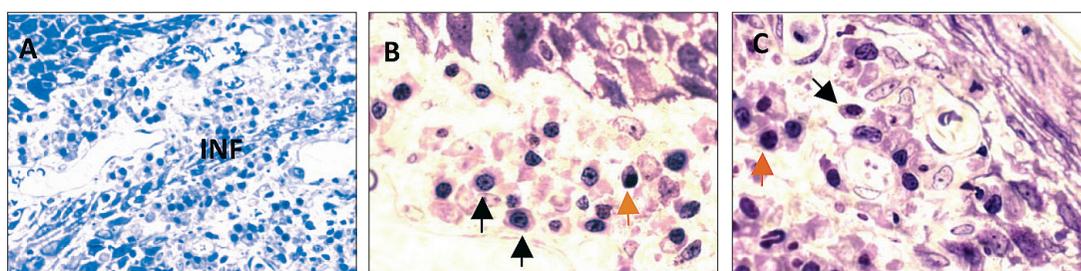


Figura 3.48 – Aspeto de um grande infiltrado inflamatório (INF) com predomínio aparente de perfil linfoplasmocitário, presente no tecido conjuntivo associado ao epitélio da gengiva livre de um implante teste. Plasmócito (seta preta). Linfócito (seta laranja). (A) 400X no original. (B) e (C) 1000X no original (AT).

– Epitélio sulcular

O epitélio sulcular (ES) dos implantes teste, ao contrário do que ocorre no grupo controlo, mostra praticamente sempre uma abundante quantidade de infiltrado inflamatório na quase totalidade das lâminas observadas (Fig. 3.49A). A sua presença, bem como a de placa bacteriana, é igualmente visível sobre a superfície do implante e respetivo pilar, a nível do sulco peri-implantar (Figs. 3.49B e 3.50A e B). A nível do colo do implante é igualmente visível a presença de células com perfil inflamatório (Fig. 3.51).

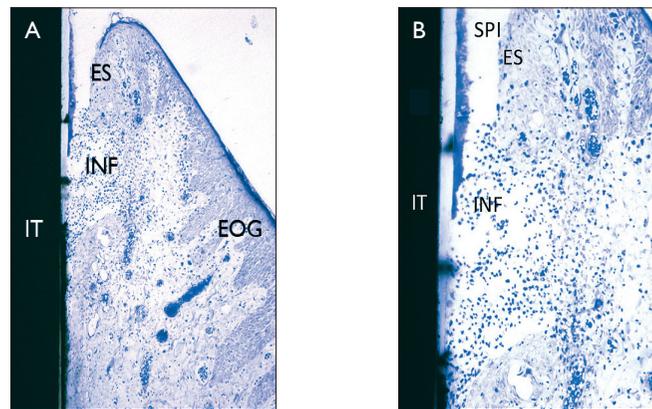


Figura 3.49 – (A) Aspeto de um grande infiltrado inflamatório situado no sulco peri-implantar e no epitélio sulcular, originando uma forte desorganização deste epitélio. 40X no original. (B) Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior mostrando a destruição da integridade estrutural do epitélio sulcular e do córion adjacente. 200X no original (AT).

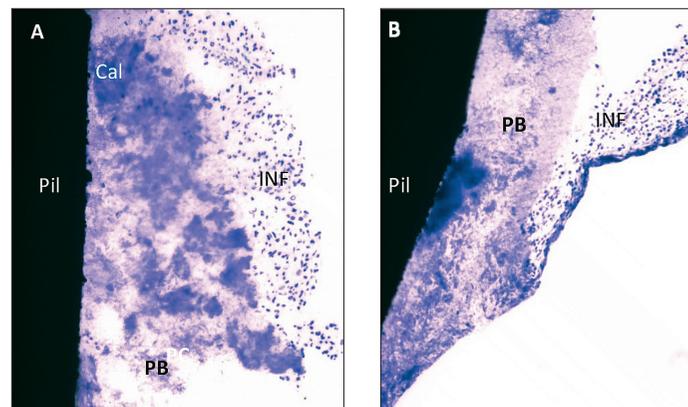


Figura 3.50 – (A) e (B) Pormenor da presença de placa bacteriana (PB) e cálculos (Cal) situados a nível do pilar de cicatrização (Pil). (A) 200X no original. (B) 100X no original (AT).

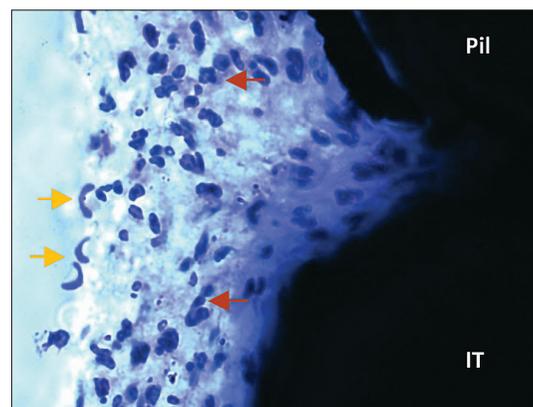


Figura 3.51 – Existência de grande número de células inflamatórias (setas vermelhas) e hemáceas (setas laranja) localizado a nível do colo do implante. 1000X no original (AT).

As células inflamatórias presentes a nível do epitélio do sulco, provocaram inúmeras vezes a destruição da sua integridade estrutural, permitindo observar a existência de uma continuidade entre as células do infiltrado inflamatório presentes nos tecidos (epitélio e córion) e as presentes no sulco peri-implantar (Fig. 3.52).

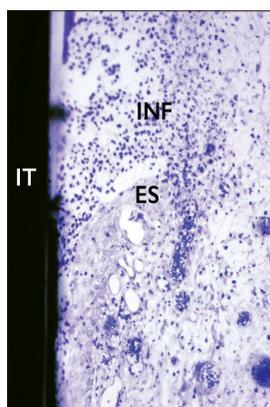


Figura 3.52 – Imagem de um infiltrado inflamatório acentuado existente no sulco peri-implantar adjacente ao epitélio sulcular de um implante teste. 200X no original (AT).

Esta destruição ocorre ao longo de toda a sua extensão, desde a zona mais coronal (Figs 3.52A e B) até à sua porção mais apical (Fig 3.49B).

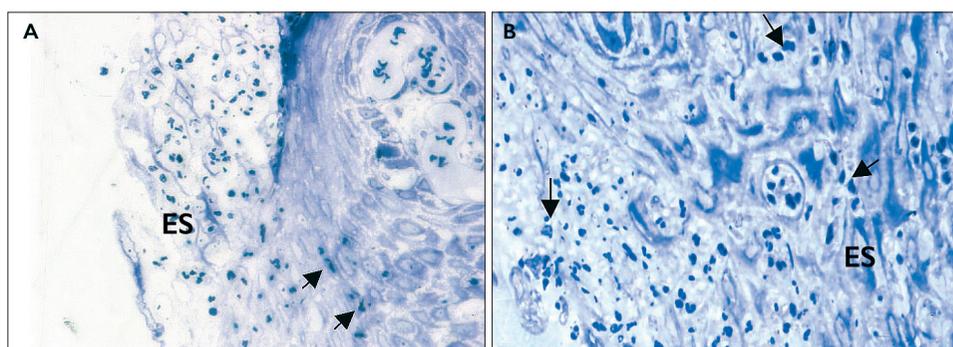


Figura 3.53 – Pormenor da desorganização estrutural das células constituintes do epitélio sulcular devido à presença de numerosas células com aparente perfil inflamatório (seta). (A) 400X no original. (B) 1000X no original (AT).

O córion adjacente ao epitélio sulcular apresentou um considerável aumento de vasos sanguíneos, quer em número quer em calibre, acompanhado por um infiltrado constituído por células com características inflamatórias (Fig. 3.54). Toda esta situação vai provocar uma grande alteração da sua arquitetura normal. Com efeito regista-se nesta região a presença de uma considerável densidade de macrófagos e de células linfo-plasmocitárias bem como uma desorganização das fibras de colagénio (Figs. 3.55 e 3.56).

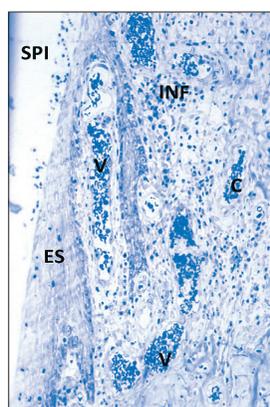


Figura 3.54 – Imagem de uma área do córion adjacente ao epitélio sulcular apresentando um considerável aumento de vasos sanguíneos e um acentuado infiltrado inflamatório. Implante teste (IT). 200X no original (AT).

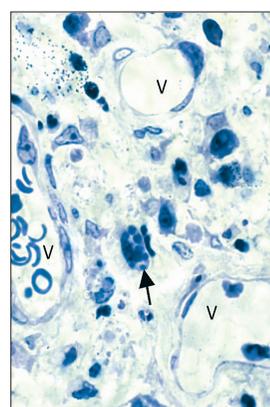


Figura 3.55 – Presença de células com aparente perfil macrófágico (seta) e dilatação vascular (V) existente numa zona do córion adjacente ao epitélio sulcular. 1000X no original (AT).

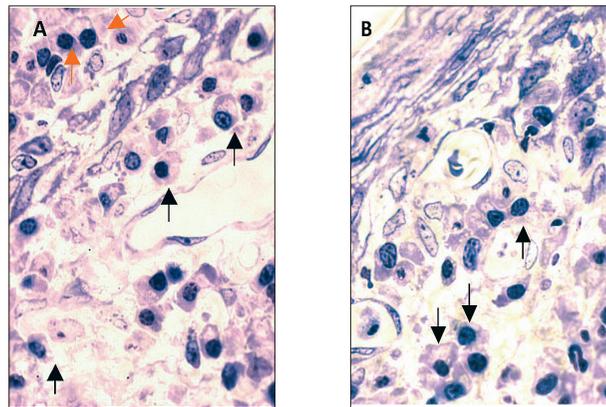


Figura 3.56 – Aspeto da considerável densidade de linfócitos (seta laranja) e plasmócitos (seta preta) frequentemente encontrada no córion associado ao epitélio sulcular dos implantes teste. 1000X no original (AT).

– Epitélio juncional

Na maioria dos cortes histológicos o epitélio juncional apresenta uma estrutura pouco alterada, com a presença de células características de um infiltrado inflamatório (Figs. 3.57A e B). Porém, nalguns cortes histológicos verifica-se a presença de um epitélio juncional com pregas epiteliais, isto é *Rete Pegs*, principalmente na sua porção mais coronal, o que indicia um sinal inflamatório (Fig. 3.57A). Da mesma forma por vezes é possível observar a destruição da organização do EJ devido à presença de um infiltrado inflamatório (Fig. 3.58).

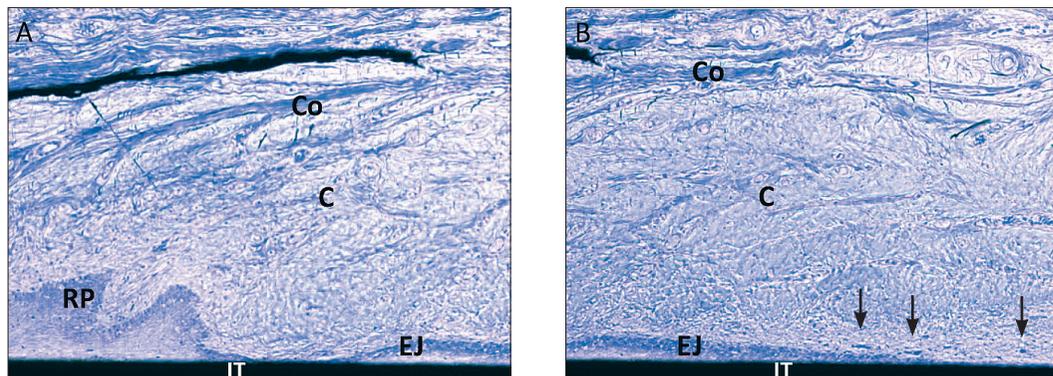


Figura 3.57 – (A) e (B) Zonas contíguas de epitélio juncional (EJ) presente num implante teste onde são visíveis *Rete Pegs* (RP) na sua porção mais coronal (A). Na zona mais apical do epitélio juncional são visíveis células de perfil inflamatório (seta) (B). 200X no original (AT).

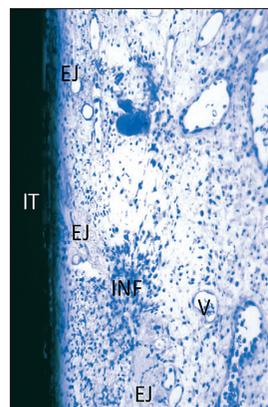


Figura 3.58 – Aspeto de elevada densidade de infiltrado inflamatório destruindo a organização estrutural do epitélio juncional adjacente a um implante teste. 200X no original (AT).

– Tecido conjuntivo subjacente ao epitélio juncional

Ao contrário do que foi descrito nos implantes controlo, foi frequente a presença de um infiltrado inflamatório nesta região, sendo possível observar numerosas células inflamatórias maioritariamente localizadas entre a superfície do implante e as fibras de colagénio características desta zona, ou seja adjacente à superfície do implante. (Fig. 3.59).

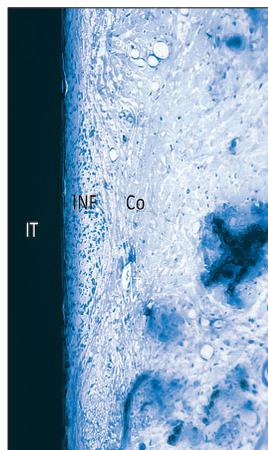


Figura 3.59 – Presença de um infiltrado inflamatório localizado entre a superfície do implante teste e o tecido conjuntivo adjacente (A). Feixes de colagénio (Co). 400X no original (AT).

As fibras de colagénio observadas nesta região apresentam-se com uma direção paralela à superfície do implante aparentando uma organização em feixes (Fig. 3.60).

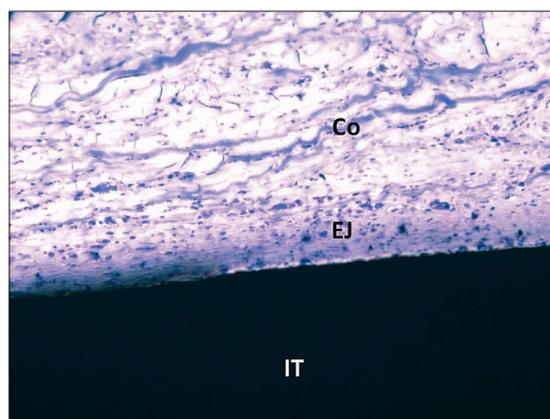


Figura 3.60 – Epitélio juncional com considerável infiltrado inflamatório. São igualmente visíveis feixes de fibras de colagénio. 200X no original (AT).

– Tecido ósseo

O tecido ósseo observado nos implantes teste mostra uma nítida predominância de processos de reabsorção. De facto são visíveis numerosos cones de reabsorção sem formação óssea associada. Também na superfície adjacente aos implantes é frequente verificar-se uma mais deficiente osteointegração traduzida numa aparente diminuição do número de áreas de contacto entre o tecido ósseo e o implante (Fig. 3.61B).

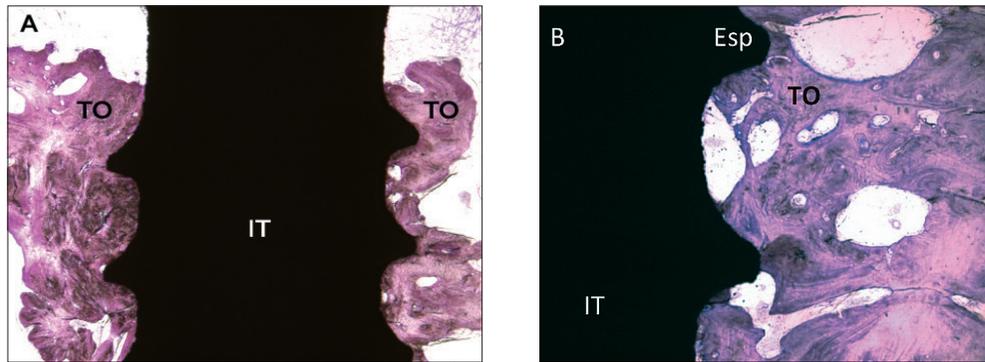


Figura 3.61 – Aspeto da localização, organização e zonas de contacto do tecido ósseo (TO) relativamente a um implante teste (A), que a nível das suas espiras (Esp) quer entre as mesmas. 20X no original. Presença de considerável número de cones de reabsorção em contacto e próximos da superfície do implante (B). 40X no original (AT).

Nas regiões subperiósticas, nomeadamente a nível dos sistemas circunferenciais externos foi possível observar uma superfície festoneada, rica em lacunas de Howship denunciando uma nítida actividade de reabsorção osteoclástica (Fig. 3.62). Com efeito, ao contrário do que se verificou nos implantes controlo, não se consegue observar a presença de um reforço de tecido ósseo marginal caracterizado por um sistema circunferencial externo rico em fibras de Sharpey bem como um periosteio evidente. Tal como mostram as figuras 3.44B e 3.62 é nítida a diferença nas áreas de tecido ósseo subperióstico entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste.

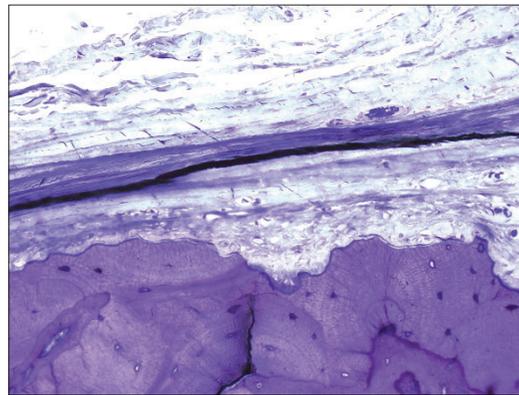


Figura 3.62 – Região subperiostica contígua a um implante teste. Observa-se uma predominância de áreas de reabsorção osteoclástica no tecido ósseo adjacente ao implante teste. 200X no original (AT).

Também foi possível observar em alguns cortes histológicos a presença de tecido ósseo numa localização mais apical, relativamente ao implante, não envolvendo algumas das espiras do implante. (Fig. 3.63).

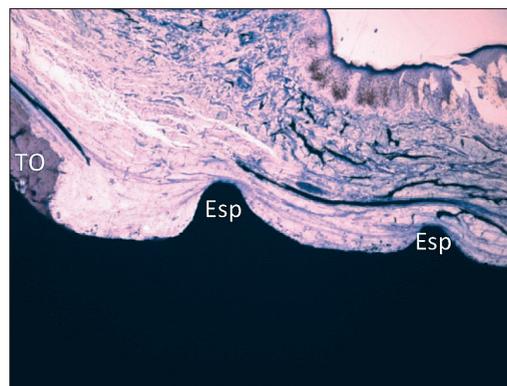


Figura 3.63 – Localização do tecido ósseo (TO) relativamente ao corpo de um implante teste. Face vestibular. 40X no original (AT).

Da mesma forma, as áreas de tecido ósseo de formação recente, tão frequentemente encontradas nos implantes controlo, são aqui muito mais escassas, notando-se uma nítida predominância de áreas de tecido ósseo em reabsorção (Fig. 3.64).

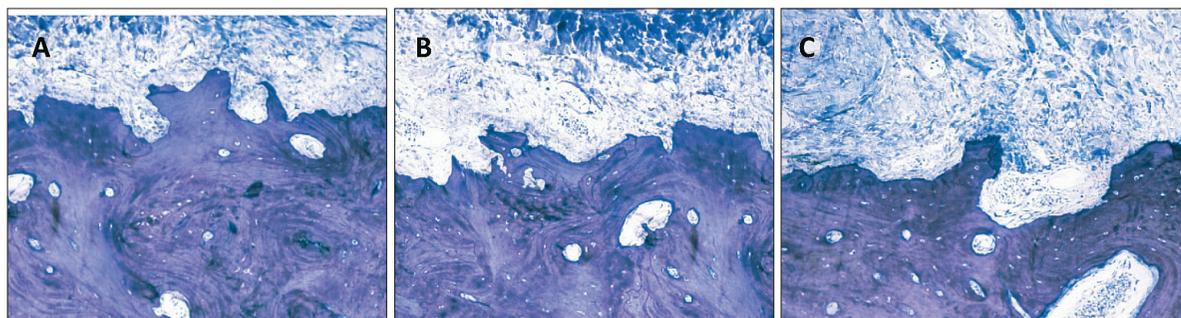


Figura 3.64 – Pormenor da região subperiosteica das apófises alveolares de implantes teste, correspondentes à crista óssea adjacente ao implante, onde se observa o predomínio de áreas de reabsorção de tecido ósseo (A) (B) e (C). 40X no original (AT).

Em síntese, nos implantes teste verifica-se um nítido predomínio de processos inflamatórios observados tanto no córion, como nos tecidos epiteliais, como no sulco peri-implantar, sendo inclusive possível observar, adjacente aos implantes, a existência de placa bacteriana acompanhada de células que mantêm um perfil inflamatório.

De igual modo nas áreas situadas entre a parte mais apical do epitélio juncional e o tecido ósseo encontrou-se, quando comparado com os implantes controlo, uma muito maior densidade de células com carácter inflamatório.

Finalmente, as imagens relativas ao tecido ósseo adjacente ao implante mostraram cones de reabsorção-formação óssea com uma preponderância nítida de áreas de reabsorção e escassas áreas de tecido ósseo neoformado.

3.7.2 – Resultados histológicos quantitativos - histomorfometria

Para cada uma das medidas histológicas analisadas procedeu-se inicialmente à comparação das quatro faces dos implantes entre si (mesial, distal, vestibular e lingual) para cada grupo. De seguida, e ainda para cada uma das medidas, procedeu-se à comparação intergrupo.

3.7.2.1 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que o valor (médio) mais elevado da distância MG-aEJ foi encontrado na face distal (2,92mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face lingual (1,79mm) (tabela 3.30).

Tabela 3.30 – Média das distâncias histológicas entre as distintas referências, para o grupo de implantes controlo.

Medidas histológicas (distância em milímetros)									
	MG-aEJ	MG-aES	CO-aES	CO-aEJ	CO-MG	OI-MG	OI-CO	MG-aINF	% INF [#]
Vestibular	2,69	2,17	1,92	1,38	4,18	1,15	3,13	1,85	0,92
Lingual	1,79	0,74	1,84	0,89	2,65	-0,13	2,87	na	na
Mesial	2,45	1,83	1,55	0,84	3,42	0,73	2,51	na	na
Distal	2,92	2,44	1,33	0,79	3,54	1,07	2,68	Na	na

Abreviaturas: MG: margem gengival; aEJ: zona apical do epitélio juncional; aES: zona apical do sulco gengival; CO: crista óssea; OI: ombro do implante; aINF: zona apical do infiltrado inflamatório; na: não aplicável.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 8.400$; $p = 0,038$) em pelo duas faces relativamente à distância medida, tendo-se identificado por testes *post-hoc* as faces lingual e distal ($p=0,037$), sendo a distal a que apresenta a distância mais elevada (anexo – tabela P).

Para o grupo implantes teste a distância (média) mais elevada entre o MG-aEJ foi registada na face vestibular (2,92mm), tendo a menor sido registada na face lingual (1,6mm) (tabela 3.31).

Tabela 3.31 – Média das distâncias histológicas entre as distintas referências, para o grupo de implantes teste.

Medidas histológicas (distância em milímetros)									
	MG-aEJ	MG-aES	CO-aES	CO-aEJ	CO-MG	OI-MG	OI-CO	MG-aINF	%INF
Vestibular	2,92	1,88	2,7	1,63	4,55	1,29	3,01	2,63	5,9
Lingual	1,6	1,15	1,37	0,93	2,51	-0,36	2,87	na	na
Mesial	2,34	2,12	1,32	0,91	3,23	0,57	2,7	na	na
Distal	2,66	2,24	1,23	0,76	3,34	0,74	2,62	na	na

Abreviaturas: MG: margem gengival; aEJ: zona apical do epitélio juncional; aSG: zona apical do sulco gengival; CO: crista óssea; OI:ombro do implante; aINF: zona apical do infiltrado inflamatório; na:não aplicável.

Existem diferenças estatisticamente significativas marginais ($\chi^2(3) = 8.067$; $p = 0,045$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida. Sendo as diferenças estatisticamente marginais a aplicação de uma correção para comparações múltiplas elimina as diferenças em cada grupo.

Relativamente à comparação intergrupo verificou-se que a média e desvio padrão da distância MG-aEJ nos implantes controlo foi de $2,35 \pm 0,52$ mm enquanto nos implantes teste foi de $2,32 \pm 0,60$ mm.

Tabela 3.32 – Representação dos resultados (média e desvio padrão) para as diferentes variáveis nos implantes controlo (IC) e implantes teste (IT).

Medidas histológicas (média e desvio padrão) (mm)									
	MG-aEJ	MG-aES	CO-aES	CO - aEJ	MG-CO	OI-MG	OI-CO	MG-aINF	%INF*
IC	$2,35 \pm 0,52$	$1,64 \pm 0,58$	$1,80 \pm 0,57$	$1,01 \pm 0,40$	$3,45 \pm 0,42$	$0,68 \pm 0,46$	$2,87 \pm 0,43$	$1,85 \pm 0,53$	$0,92 \pm 0,62$
IT	$2,32 \pm 0,60$	$1,79 \pm 0,68$	$1,68 \pm 0,91$	$1,09 \pm 0,62$	$3,39 \pm 0,62$	$0,55 \pm 0,66$	$2,87 \pm 0,48$	$2,63 \pm 0,86$	$5,90 \pm 2,53$

Abreviaturas: MG: margem gengival; aEJ: zona apical do epitélio juncional; aSG: zona apical do sulco gengival; CO: crista óssea; OI:ombro do implante; aINF: zona apical do infiltrado inflamatório; na:não aplicável.

Não se constatou a presença de diferenças estatisticamente significativas ($U = 58.00$; $Z = -0.492$; $p = 0,622$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 26).

Quando se comparou as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 48.00$; $Z = -0.114$; $p=0,909$), mesial ($U = 43.00$; $Z = -0.494$; $p=0,621$), distal ($U = 25.00$; $Z = -0.542$; $p=0,588$) e lingual ($U = 36.00$; $Z = -1.338$; $p=0,181$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 26).

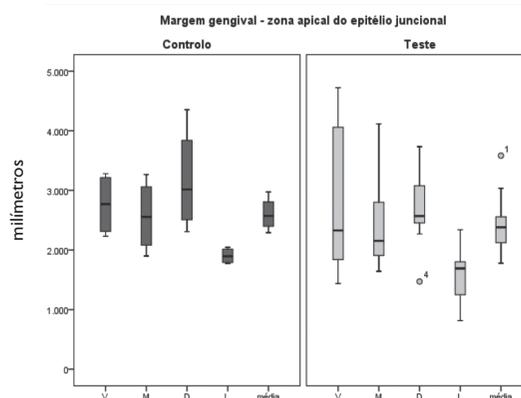


Gráfico 26 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância da margem gengival até à zona apical do epitélio juncional.

3.7.2.2 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES)

Para o grupo implantes controlo o valor (média) mais elevado da distância MG-aES foi encontrado na face distal (2,44mm) deste grupo de implantes, tendo a face lingual apresentado o menor valor (média) (0,74mm) (tabela 3.30).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3)= 11.880$; $p=0,008$) em pelo menos duas faces relativamente à distância medida. Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as faces lingual e vestibular ($p=0,02$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) e lingual e distal ($p=0,02$) (distal apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela Q).

Para o grupo implantes teste verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância MG-aSG foi encontrado na face distal (2,24mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face lingual (1,15mm) (tabela 3.31).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3)= 6.450$; $p=0,092$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

Relativamente à comparação entre ambos grupos a distância MG-aSG (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $1,64 \pm 0,58$ mm, enquanto nos implantes teste foi de $1,79 \pm 0,68$ mm (tabela 3.32).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($U = 62,00$; $Z = -0,577$; $p=0,564$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 27).

Na comparação das mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 47,00$; $Z = -0,886$; $p=0,375$), mesial ($U = 46,00$; $Z = -0,266$; $p=0,790$), distal ($U = 33,00$; $Z = 0,000$; $p=1,000$) e lingual ($U = 30,00$; $Z = -1,512$; $p=0,131$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 27).

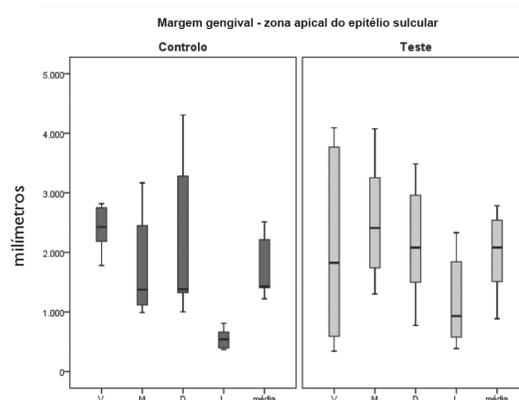


Gráfico 27 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância da margem gengival até à zona apical do epitélio sulcular.

Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.3 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio sulcular (CO-aES)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância CO-aES foi encontrado na face vestibular (1,92mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face distal (1,33mm) (tabela 3.30).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 0.600$; $p=0,896$) em pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

Para o grupo implantes teste a distância (média) mais elevada entre o CO-aES foi registada na face vestibular (2,7mm), tendo a menor sido registada na face distal (1,23mm) (tabela 3.31).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 10.050$; $p=0,018$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se existir uma diferença estatisticamente significativa entre as faces mesial e vestibular ($p=0,012$), (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela R).

Relativamente à comparação entre ambos grupos a distância CO-aES (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $1,80 \pm 0,57$ mm, enquanto nos implantes teste foi de $1,68 \pm 0,91$ mm (tabela 3.32).

Não se verificou a presença de diferenças estatisticamente significativas ($U = 63.00$; $Z = -1.520$; $p=0,603$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 28).

Comparando as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 38.00$; $Z = -1.477$; $p=0,140$), mesial ($U = 42.00$; $Z = -0.570$; $p=0,569$), distal ($U = 30.00$; $Z = -0.302$; $p=0,763$) e lingual ($U = 28.00$; $Z = -1.663$; $p=0,096$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 28).

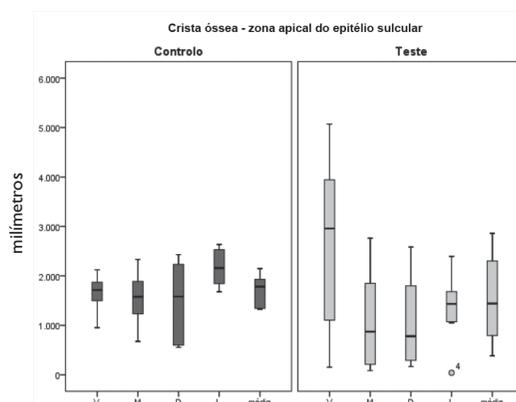


Gráfico 28 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância da crista óssea até à zona apical do epitélio sulcular.

Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.4 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio juncional (CO-aEJ)

No que concerne ao grupo implantes controlo o valor (média) mais elevado da distância CO-aEJ foi encontrado na face vestibular (1,38 mm) deste grupo de implantes, tendo o menor valor (média) sido avaliado na face distal (0,79mm) (tabela 3.30).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 5.400$; $p=0,145$) em pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

No que concerne ao grupo implantes teste verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância MG-aEJ foi encontrado na face vestibular (1,63mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face distal (0,76mm) (tabela 3.31).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 9.267$; $p = 0,026$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida. Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as faces mesial e vestibular ($p = 0,021$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela S).

Relativamente à comparação entre ambos grupos a distância CO-aEJ (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $1,01 \pm 0,40$ mm, enquanto nos implantes teste foi de $1,09 \pm 0,62$ mm (tabela 3.32).

Não se verificou a presença de diferenças estatisticamente significativas ($U = 61.00$; $Z = -0.308$; $p = 0,758$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 29).

Comparando as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 38.00$; $Z = -0.874$; $p = 0,382$), mesial ($U = 46.00$; $Z = -0.266$; $p = 0,790$), distal ($U = 25.00$; $Z = -0.542$; $p = 0,588$) e lingual ($U = 48.00$; $Z = -0.493$; $p = 0,622$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 29).

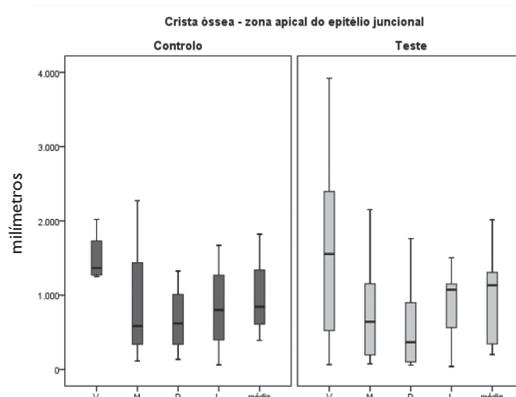


Gráfico 29 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância da crista óssea até à zona apical do epitélio juncional.

Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.5 – Distância da crista óssea à margem gengival (CO-MG)

Para o grupo implantes controlo verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância CO-MG foi encontrado na face vestibular (4,18mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face lingual (2,65mm) (tabela 3.30).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 27.300$; $p < 0.001$) em pelo duas faces relativamente à distância medida. Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as faces lingual e mesial ($p = 0,043$), (mesial apresenta o valor mais elevado), lingual e distal ($p = 0,002$) (distal apresenta o valor mais elevado) e entre as faces lingual e vestibular ($p = 0,000$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela T).

Para o grupo implantes teste a distância (média) mais elevada entre o CO-MG foi registada na face vestibular (4,55mm), tendo a menor sido registada na face lingual (2,51mm) (tabela 3.31).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 21.960$; $p < 0.001$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

Da realização de testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se existir uma diferença estatisticamente significativa entre as faces lingual e vestibular ($p=0,000$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela U).

Relativamente à comparação intergrupo a distância CO-MG (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $3,45 \pm 0,42\text{mm}$, enquanto nos implantes teste foi de $3,39 \pm 0,62\text{mm}$ (tabela 3.32).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($U = 68,00$; $Z = -0,231$; $p=0,817$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 30).

Da mesma forma, comparando as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 40,00$; $Z = -1,600$; $p=0,110$), mesial ($U = 62,00$; $Z = -0,577$; $p=0,564$), distal ($U = 63,00$; $Z = -0,520$; $p=0,603$) e lingual ($U = 53,00$; $Z = -0,800$; $p=0,424$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 30).

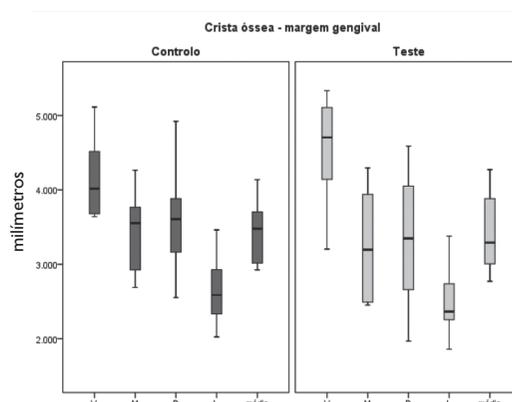


Gráfico 30 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo). Variável analisada: distância da crista óssea até à margem gengival. Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.6 – Distância do ombro do implante à margem gengival (OI-MG)

Para o grupo implantes controlo a distância (média) mais elevada entre o OI-MG foi registada na face vestibular (1,15mm), tendo a menor sido registada na face lingual (-0,13mm) (tabela 3.30).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 22,091$; $p < 0,001$) em pelo duas faces relativamente à distância medida. Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que há diferença estatisticamente significativa entre as faces lingual e mesial ($p=0,030$) (sendo a mesial a mais elevada), lingual e distal ($p=0,001$) (a distal a mais elevada) e lingual e vestibular ($p=0,000$) (a vestibular a mais elevada) (anexo – tabela V).

Para o grupo implantes teste verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância MG-aSG foi encontrado na face vestibular (1,29mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face lingual (-0,36mm) (tabela 3.31).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 17,640$; $p=0,001$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida. Após a realização de testes *post-hoc* verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as faces lingual e distal ($p=0,011$) (distal apresenta o valor mais elevado) e lingual e vestibular ($p=0,000$) (vestibular apresenta o valor mais elevado). (anexo – tabela X).

Relativamente à comparação entre ambos grupos a distância OI-MG (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $0,68 \pm 0,46\text{mm}$, enquanto nos implantes teste foi de $0,55 \pm 0,66\text{mm}$ (tabela 3.32).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($U = 65.00$; $Z = -0.404$; $p=0,686$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 31).

Da mesma forma, comparando as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 51.00$; $Z = -0.923$; $p=0,356$), mesial ($U = 66.00$; $Z = -0.346$; $p=0,729$), distal ($U = 55.00$; $Z = -0.677$; $p=0,498$) e lingual ($U = 55.00$; $Z = -0.677$; $p=0,498$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 31).

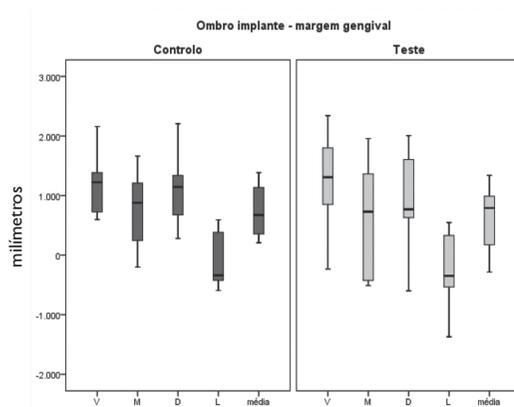


Gráfico 31 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância do ombro do implante até à margem gengival.

Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.7 – Distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO)

Para os implantes controlo verificou-se que o valor (média) mais elevado da distância OI-CO foi encontrado na face vestibular (3,13mm) deste grupo de implantes. Em contrapartida o menor valor (média) foi avaliado na face mesial (2,51 mm) (tabela 3.30).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 10.309$; $p=0,016$) em pelo menos duas faces relativamente à distância medida.

Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa entre as faces mesial e vestibular ($p=0,030$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela Z).

Para o grupo implantes teste a distância (média) mais elevada entre o OI-CO foi registada na face vestibular (3,01 mm), tendo a menor sido registada na face distal (2,62mm) (tabela 3.31).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2(3) = 14.760$; $p=0,002$) entre pelo menos duas faces relativamente à distância medida. Após realização dos testes *post-hoc* entre as diferentes faces verificou-se que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as faces distal e vestibular ($p=0,002$) (vestibular apresenta o valor mais elevado) (anexo – tabela AA).

Relativamente à comparação intergrupo a distância OI-CO (média e desvio padrão) nos implantes controlo foi de $2,87 \pm 0,43\text{mm}$, enquanto nos implantes teste foi de $2,87 \pm 0,48\text{mm}$ (tabela 3.32).

Não existem diferenças estatisticamente significativas ($U = 67.00$; $Z = -0.289$; $p=0,773$) para a média de todas as faces entre o grupo implantes controlo e o grupo implantes teste (gráfico 32).

Da mesma forma, comparando as mesmas faces de ambos grupos de implantes verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas entre as faces vestibular ($U = 56.00$; $Z = -0.615$; $p=0,538$), mesial ($U = 69.00$; $Z = -0.173$; $p=0,862$), distal ($U = 58.00$; $Z = -0.492$; $p=0,622$) e lingual ($U = 60.00$; $Z = -0.369$; $p=0,712$) dos implantes controlo e implantes teste (gráfico 32).

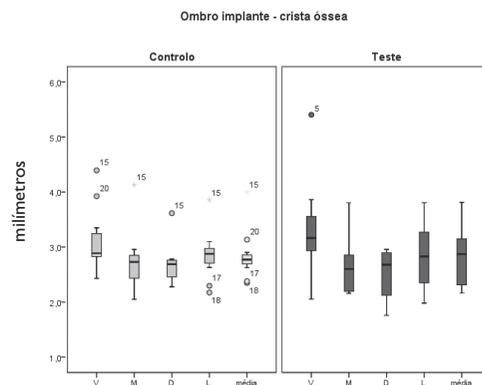


Gráfico 32 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular (V), mesial (M), distal (D) e lingual (L) dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (implantes teste e implantes controlo).

Variável analisada: distância (milímetros – eixo dos YY) do ombro do implante até à crista óssea.

Controlo: grupo implantes controlo; Teste: grupo implantes teste.

3.7.2.8 – Distância da margem gengival à zona apical do infiltrado inflamatório (MG-aINF)

Para o grupo implantes controlo a distância MG-aINF, medida apenas na face vestibular dos implantes, foi de 1,85mm, enquanto que para o grupo implantes teste a mesma, também medida apenas na face vestibular dos implantes, foi de 1,85mm (tabela 3.32).

Relativamente à comparação intergrupo a distância entre a margem gengival (MG) e a porção mais apical do infiltrado inflamatório celular (aINF) apenas foi avaliada na face vestibular de cada implante. O seu valor foi de $1,85 \pm 0,53$ mm para o grupo implantes controlo e $2,63 \pm 0,86$ mm para o grupo implantes teste (tabela 3.32).

Existem diferenças estatisticamente significativas ($Z = -2.573$; $p=0,018$) da variável MG-aINF entre os dois grupos (gráfico 33) (anexo – tabela AB).

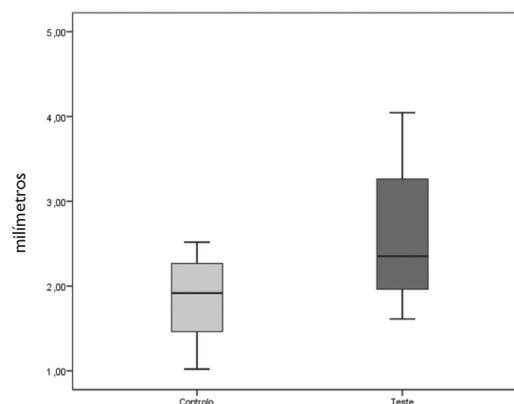


Gráfico 33 – Diagrama de extremos e quartis relativo à distância MG-aINF, para os implantes teste e implantes controlo.

3.7.2.9 – Percentagem de infiltrado inflamatório (% INF)

Para o grupo implantes controlo a % INF medida apenas na face vestibular dos implantes, foi de 0,92% (tabela 3.30).

Para o grupo implantes teste a % INF medida apenas na face vestibular dos implantes foi de 5,9% (tabela 3.31).

Relativamente à comparação entre ambos grupos a percentagem de infiltrado inflamatório celular (média e desvio padrão) apenas foi avaliada na face vestibular de cada implante. O seu valor para o grupo implantes controlo foi de $0,92 \pm 0,62$, enquanto para o grupo implantes teste foi de $5,90 \pm 2,53$ (tabela 3.32).

Relativamente à percentagem de INF determinada para o grupo implantes teste e o grupo implantes controlo verificamos que há diferenças estatisticamente significativas ($U = 3.000$; $Z = -3.878$; $p < 0.001$) entre ambos grupos, sendo que o seu valor é mais elevado no grupo implantes teste ($5,90 \pm 2,53$).

3.8 – Correlação entre variáveis

3.8.1 – Profundidade de sondagem (PS) (variável clínica) versus distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ) (variável histológica).

Para o grupo implantes controlo verificou-se que não existe correlação estatisticamente significativa entre as variáveis PS e MG-aEJ (coef. corr. Spearman = -0.410 ; $p=0,047$) (gráfico 34).

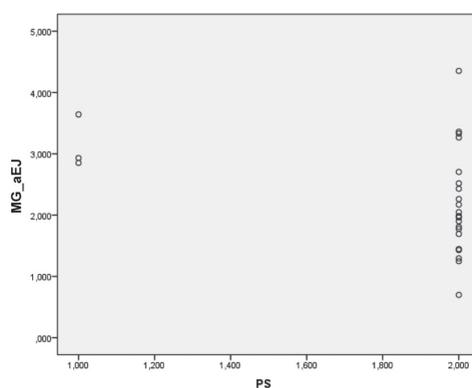


Gráfico 34 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio juncional, no grupo implantes controlo.

Para o grupo implantes teste verificou-se que existe uma correlação positiva, todavia fraca, estatisticamente significativa entre as variáveis PS e MG-aEJ (coef. corr. Spearman = -0.403 ; $p=0,022$) (gráfico 35).

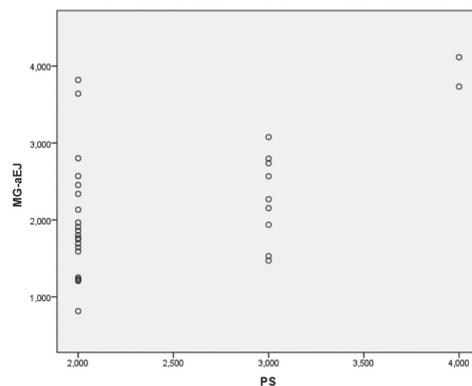


Gráfico 35 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio juncional no grupo implantes teste.

3.8.2 – Profundidade de sondagem (PS) (variável clínica) versus distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES) (variável histológica).

Para o implantes controlo verificou-se que não existe correlação estatisticamente significativa entre as variáveis (coef. corr. Spearman = -0.307; p=0,135) (gráfico 36).

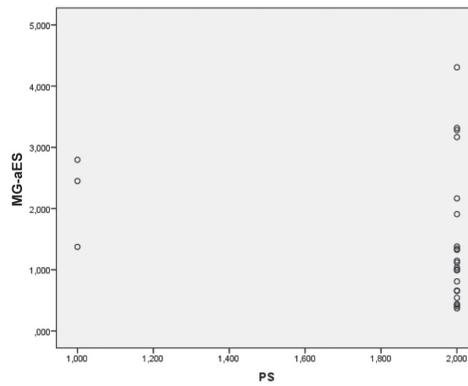


Gráfico 36 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio sulcular, no grupo implantes controlo.

Para os implantes teste verificou-se que não existe uma correlação estatisticamente significativa entre as variáveis (coef. corr. Spearman = -0.330; p=0,065) (gráfico 37).

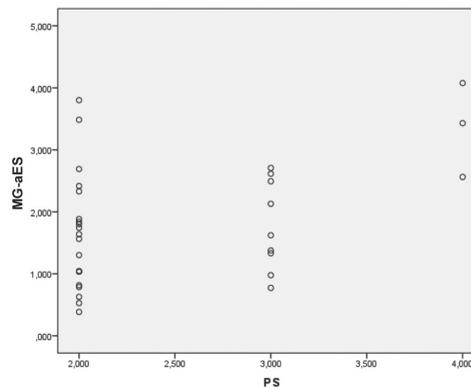


Gráfico 37 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio sulcular, no grupo implantes teste.

3.8.3 – Distância do ombro do implante à crista óssea (ODI-aOI) (variável radiográfica) versus distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO) (variável histológica).

Para o grupo implantes controlo verificou-se que existe correlação positiva, todavia fraca, estatisticamente significativa entre as variáveis (coef. corr. Spearman = 0.489; $p=0,015$) (gráfico 38).

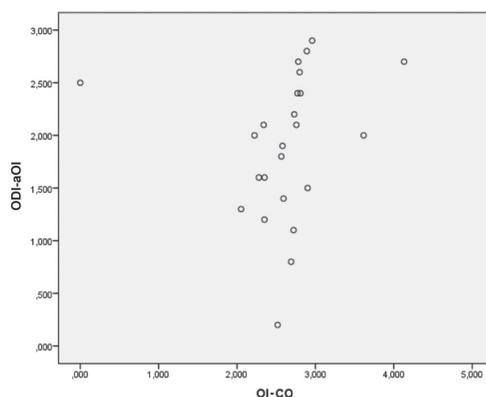


Gráfico 38 – Gráfico de dispersão entre a distância ombro do implante-crista óssea (radiográfica) e ombro do implante-crista óssea (histológica), no grupo implantes controlo.

Para os implantes teste verificou-se que existe uma correlação positiva, todavia fraca, estatisticamente significativa entre as variáveis (coef. corr. Spearman = 0.484; $p=0,022$) (gráfico 39).

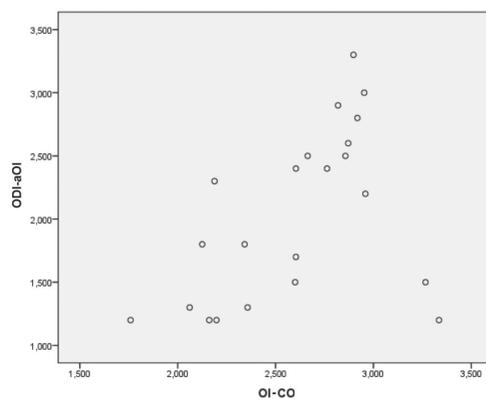


Gráfico 39 – Gráfico de dispersão entre a distância ombro do implante-crista óssea (radiográfica) e ombro do implante-crista óssea (histológica), no grupo implantes teste.

4 – Discussão

A experimentação animal apresenta-se como um apoio basilar no progresso da investigação científica. Porém, devemos ter sempre presente que a experimentação animal apresenta um carácter limitado no que diz respeito à sua translação direta ao Homem, pois nenhuma espécie animal apresenta um comportamento e características anatómicas, fisiológicas e biológicas exatamente iguais às humanas. Apesar de nem sempre ser possível extrapolar, de forma totalmente segura, os resultados obtidos na experimentação animal, é inquestionável o progresso que permite em múltiplas áreas da saúde, tornando-se fulcral na evolução de diversas áreas médicas, desde que aplicada de forma ética, conseqüente, no cumprimento de toda a legislação abrangente e com normas de conduta adequadas^{153, 285, 286}.

Um “modelo animal” pode ser definido como um animal vivo não-humano com um processo patológico ou lesão, adquiridos de forma natural ou patologicamente induzido, que permita a resolução da hipótese a investigar e que seja semelhante à condição encontrada na espécie humana. Para além do modelo animal, mas sendo parte do mesmo, o “modelo experimental” é definido como a associação entre um determinado animal e um procedimento cirúrgico cuja finalidade é induzir um tipo específico de defeito num determinado local anatómico²⁸⁷. A escolha do modelo animal e experimental são parte integrante da investigação pré-clínica. Esta é realizada de modo a avaliar conceitos de prova-do-princípio, isto é, a caracterização de mecanismos biológicos, fisiológicos e patológicos, estratégias de tratamento, segurança e possíveis reações adversas a materiais/tecnologias/aparelhos antes da sua aplicação clínica²⁷⁰.

A escolha de modelos de experimentação animal adequados que preencham estes requisitos é, em si mesmo, um objectivo atual da investigação, apesar de ser muito difícil ou quase impossível de alcançar²⁸⁸. Esta escolha é o primeiro passo crítico no desenho de um procedimento experimental bem como na possível extrapolação dos resultados^{289, 290}. De acordo com uma publicação de Einhorn, em 1999²⁹¹, a utilização apropriada de modelos animais na investigação inicia-se com a criteriosa consideração da questão colocada, tornando-se desta forma evidente a necessidade de pensar toda a fase experimental a montante da mesma. Após a seleção cuidadosa da questão a responder coloca-se a escolha do modelo experimental adequado que deve ter em conta os seguintes fatores^{176, 292}:

- 1) adequabilidade do modelo animal;
- 2) potencial e extrapolação expectável para o ambiente clínico;
- 3) homogeneidade genética do modelo animal específico;
- 4) disponibilidade de informação sobre anatomia e fisiologia do modelo utilizado;
- 5) custo e disponibilidade do modelo;
- 6) generalização dos resultados ao longo da espécie;
- 7) facilidade e adaptabilidade do modelo a manipulações experimentais e laboratoriais;
- 8) considerações ecológicas;
- 9) implicações éticas e sociais sendo que este último possui uma crescente importância nas sociedades ditas mais desenvolvidas.

A escolha do número de animais a utilizar para fins experimentais deve ter sempre em linha de conta o “Princípio dos 3 R’s”: Substituição (“*Replacement*”), Redução (“*Reduction*”) e Refinação (“*Refinement*”)²⁹³. Desta forma pretende-se, sempre que possível, substituir um animal vivo por material inanimado, bem como reduzir o seu número ao mínimo indispensável de forma a obter informação em determinada quantidade e precisão. Da

mesma forma devemos refinar o procedimento experimental através da diminuição da incidência ou severidade de procedimentos desumanos aplicados aos animais que serão utilizados²⁹⁴. Para além do “Princípio dos 3 R’s” a escolha do modelo animal deve ser conduzida por uma racionalidade científica alicerçada em dados baseados na melhor evidência disponível bem como numa análise crítica da literatura de referência. Esta escolha deve igualmente incorporar o melhor conhecimento em anatomia e fisiologia animal^{287, 293}. Adicionalmente, também os custos associados a um projeto de investigação devem ser tidos em consideração.

Para o presente trabalho de investigação foram tidos em conta estudos já publicados, realizados em condições semelhantes, explanados na revisão da literatura apresentada na introdução desta dissertação. O cão apresenta-se como o modelo mais adequado para este tipo de estudo tendo em conta aspectos anatómicos, fisiológicos, patológicos, biológicos e até comportamentais. Comparativamente, existe uma maior incidência de periodontite espontânea no cão que no macaco sendo a gengivite e a periodontite nos cães mais semelhantes às humanas que as de outros animais de laboratório¹⁷⁶.

A escolha da raça canídea é outro aspeto a ter em conta no procedimento experimental. Os cães utilizados para fins experimentais devem pertencer à mesma raça, ter origem pura e preferencialmente serem da mesma ninhada e de igual sexo²⁹⁵, o que foi quase integralmente cumprido neste projecto pois os 6 animais eram de origem pura e com o mesmo sexo. No entanto revelou-se impossível o laboratório fornecer para o presente projecto de investigação seis cães do mesmo sexo, com a idade requerida e provenientes da mesma ninhada. A raça Beagle, devido a características já mencionadas, apresenta-se como a mais utilizada em estudos relacionados com indução ou tratamento de defeitos peri-implantares¹⁷⁹.

Este animal é amplamente utilizado como modelo para estudos relacionados tanto com o desenvolvimento espontâneo, como induzido, da patologia periodontal, de forma a compreender a sua etiopatologia²⁹⁶. As características histológicas do periodonto normal e patológico, humano e canídeo, são semelhantes²⁹⁷. No cão, a periodontite é uma patologia de ocorrência espontânea e de etiologia microbiana e deste modo mimetiza os mecanismos fisiopatológicos da periodontite humana^{298, 299}. Adicionalmente, a sua prevalência na população canídea é considerável, apesar de variar entre as diferentes raças. Na raça Beagle a sua prevalência é elevada, mesmo aos 2 anos de idade, aumentando com a idade. Noutras raças como Labradores e “Mongrel” a prevalência de periodontite é menor^{177, 300-302}. Esta característica da raça Beagle pode tornar o seu uso em estudos relacionados com a regeneração óssea, sob condições altamente controladas, questionável²⁸⁷.

Baseado nas características anteriormente mencionadas esta raça tem sido amplamente utilizada em estudos com implantes. Numa recente revisão sistemática relativa à qualidade dos resultados reportados sobre estudos pré-clínicos *in vivo* relacionados com implantes, Vignoletti & Abrahamsson, em 2012²⁶¹, verificaram que o cão era o modelo animal mais utilizado. A sua utilização foi descrita em 438 de um total de 982 publicações incluídas na revisão. Destes 438, 199 diziam respeito a estudos sobre cicatrização/integração tecidual, 190 sobre cicatrização em locais comprometidos e 49 publicações sobre estudo/tratamento de mucosite/peri-implantite. O segundo modelo animal mais utilizado em estudos relacionados com doenças peri-implantares foi o macaco (13 publicações). Apesar de terem sido incluídos quase um milhão de estudos sobre implantes os autores afirmam que apenas 6% estão relacionados com a patogénese e tratamento de doenças peri-implantares²⁶¹.

Da mesma forma, numa recente publicação sobre modelos experimentais canídeos para investigação da peri-implantite, foi verificado que a raça Beagle foi a mais utilizada pelos investigadores, seguida pela “Mongrel” e Labrador¹⁷⁹. Uma das características já apontadas a estes animais é o facto de serem amplamente afetados por periodontite espontânea³⁰². Esta aparente desvantagem torna-se importante para o objetivo deste estudo uma vez que se pretende avaliar o efeito da placa bacteriana nos tecidos peri-implantares. Ao apresentar uma crista alveolar de dimensões consideráveis o cão é um modelo indicado para colocação de implantes e estudos subsequentes. No entanto, apesar das semelhanças, há sempre condicionantes que implicam um cuidado na

interpretação dos resultados destes estudos, cuidado este transversal à totalidade dos estudos animais. O *ratio* de remodelação óssea humana e canídea são distintos, sendo o humano mais baixo^{303, 304}. Apesar de haver semelhanças estruturais no *turnover* do osso trabecular entre o cão e o humano torna-se difícil estabelecer uma comparação exata entre ambos. O *turnover* do osso trabecular no cão é altamente variável entre as diferentes localizações e entre indivíduos e espécies, sendo a sua média em todo o corpo canídeo cerca de 100%^{286, 305}. Já nos humanos a remodelação da totalidade da massa óssea trabecular é de 5-15%, estimando-se que o *turnover* da totalidade de osso trabecular varie de 10-15% a 40-55% por ano^{305, 306}.

Para além do cão também os primatas não-humanos são bastante utilizados em estudos relacionados com a periodontite devido à sua semelhança anatómica, imunológica e microbiológica com a cavidade oral e periodonto humanos. Outras vantagens presentes nos primatas não-humanos são a ocorrência natural de periodontite e a proximidade filogenética com os humanos. No entanto, não são um modelo tão bem caracterizado quanto o canídeo, apresentam um manuseamento mais difícil bem como custos de aquisição e manutenção bastante mais elevados e ainda uma menor prevalência de periodontite espontânea^{176, 276}. Da mesma forma não podemos igualmente descuidar os riscos de transmissão de zoonoses e as implicações éticas²⁸⁶, cada vez mais pertinentes em estudos animais. Na realidade, a questão ética já levou alguns países a proibirem a utilização de primatas não-humanos para fins de investigação. Tanto quanto é do nosso conhecimento atual, não parece haver equipas veterinárias com certificação para trabalhar com estes animais em Portugal. De facto, e de acordo com os registos da Direção Geral de Veterinária, desde o ano de 2000 até à data do último registo realizado por este organismo estatal (ano de 2011) não houve qualquer procedimento experimental envolvendo macacos ou primatas não-humanos³⁰⁷.

No modelo experimental aqui apresentado pretendeu-se analisar o efeito da placa bacteriana (PB) sobre os tecidos peri-implantares. O desenvolvimento espontâneo de periodontite pelos cães Beagle torna-os adequados para estudos relacionados com a deposição de biofilme e consequente ocorrência de peri-implantite²⁸⁷. Desde há cerca de 20 anos que este modelo animal tem sido amplamente utilizado para colocação de implantes na mandíbula e posterior desenvolvimento de diferentes modelos experimentais relacionados com a peri-implantite^{185, 186, 207}.

O modelo experimental utilizado no presente trabalho experimental é um modelo comprometido. Esta caracterização baseia-se no facto do mesmo estar associado a um não controlo da placa bacteriana, contínuo, desde o período anterior até ao posterior à colocação dos implantes. Dezasseis semanas antes da colocação dos implantes o controlo de higiene oral dos animais deixou de ser realizado. Para além disso, à semelhança do que aconteceu noutros modelos experimentais^{185, 222, 223, 229, 231, 234, 247, 249}, foi administrada uma alimentação mole que propicia a acumulação de placa bacteriana. A ausência de controlo da placa bacteriana 16 semanas antes da colocação de implantes, agravada por uma dieta mole, permitiu a sua anormal acumulação e subsequente formação de placa bacteriana. Após a colocação de dois implantes em cada hemimandíbula, no período de cicatrização até à remoção da sutura (1 semana), também não se realizou qualquer controlo da placa bacteriana. O objetivo foi tentar comprometer, do ponto de vista microbiológico, este modelo experimental atribuindo-lhe uma carga microbiana superior à encontrada nos modelos experimentais para estudo da peri-implantite descritos na literatura. O presente modelo experimental que visa aumentar a presença microbiológica antes e após a colocação dos implantes não foi descrita por nenhuma equipa de investigação, tanto quanto foi possível escrutinar nos métodos de pesquisa electrónicos convencionais. Numa revisão recente de modelos experimentais canídeos para investigação da peri-implantite, foi referido que o controlo de higiene oral antes e após a colocação dos implantes variava entre uma periodicidade diária a semanal, apesar de muitos autores não fazerem qualquer referência ao programa de controlo de higiene oral após colocação dos implantes¹⁷⁹. Apesar dos animais envolvidos no presente estudo terem sido acompanhados por uma equipa veterinária diferenciada

em Medicina Dentária, e de a mesma ter verificado visualmente a crescente acumulação de placa bacteriana, esta verificação poderá, em estudos futuros, ser realizada de outra forma. Aquando do desenho experimental pode preconizar-se que, a par da observação clínica, sejam efectuadas colheitas microbiológicas antes das extrações dos pré-molares e molares mandibulares bem como ao longo do período experimental que antecede a colocação dos implantes. Desta forma, a análise microbiológica tentaria consubstanciar a observação clínica. Da mesma forma poderá ser vantajoso realizar, simultaneamente com as colheitas microbiológicas executadas nos implantes, colheitas nos dentes adjacentes aos mesmos, nomeadamente no segundo molar mandibular, bem como nos dentes antagonistas.

O efeito da acumulação de placa bacteriana sobre os tecidos gengivais e periodontais foi avaliado num estudo publicado em 1973 por Lindhe *et al.*¹⁸². Estes autores dividiram 20 cães Beagle, com 10 meses de idade, em dois grupos iguais (grupo controlo e grupo experimental). Durante o período preparatório de 8 semanas, todos os animais foram sujeitos a um cuidadoso controlo de placa bacteriana. Posteriormente, no grupo controlo, os dentes da hemimandíbula esquerda foram escovados 2 vezes por dia e no grupo experimental as áreas correspondentes não foram escovadas. Todos os animais tiveram uma dieta mole e foram examinados regularmente clínica e radiograficamente ao longo de 18 meses com recolha do exsudato gengival. Verificaram que o grupo teste começou rapidamente a formar placa bacteriana em todas as superfícies dentárias. Os molares e pré-molares mostraram uma grande acumulação de placa bacteriana logo uma a duas semanas após a suspensão de escovagem. A capacidade para formar maiores agregados de placa bacteriana foi mais pronunciada nas regiões dentárias posteriores. Gengivite foi inicialmente observada em áreas onde a placa bacteriana se começou a formar, isto é na zona de contacto entre o PM₄ e M₁. Um ligeiro eritema e edema gengival foram inicialmente detetados nos molares, um mês após início do protocolo, posteriormente nos pré-molares (aos 4 a 6 meses), e apenas aos 12 meses nos incisivos. O primeiro aumento significativo de profundidade de sondagem ocorreu aos 2 meses nos molares e pré-molares e 6 meses depois nos incisivos. Uma perda significativa de inserção ocorreu nos molares após os 6 meses e nos pré-molares e incisivos após 8 meses. Os sinais de colapso periodontal foram apenas observados em áreas de manifesta gengivite. Com este estudo os autores demonstraram que é possível induzir gengivite em Beagles jovens, que evolui gradualmente para periodontite pela simples acumulação de placa bacteriana nos dentes¹⁸².

No presente estudo experimental os dentes não foram escovados nas 16 semanas que antecederam a colocação dos implantes nem nas 17 semanas posteriores. Da mesma forma, esta ausência de controlo de PB foi acompanhada por uma dieta mole. Assim, aquando da colocação dos implantes na mandíbula a quantidade de placa bacteriana e tártaro presentes nos dentes existentes era bastante visível e compatível com um quadro clínico de gengivite. De acordo com a cronologia dos resultados do estudo de Lindhe *et al.*¹⁸² anteriormente referido, estas 16 semanas de acumulação de PB seriam suficientes para provocar uma inflamação dos tecidos moles peri-dentários bem como um aumento da profundidade de sondagem.

A escolha da idade dos cães (2,5 anos, em média) baseou-se no facto da literatura existente referir que a partir dos 2 anos de idade esta raça pode apresentar uma manifestação clínica espontânea de periodontite¹⁸². No estudo já apresentado de Lindhe *et al.*¹⁸², os autores demonstraram que cães Beagle com 10 meses de idade podem desenvolver sinais clínicos de periodontite apenas devido à acumulação de PB e dieta mole ao longo de um período de 18 meses. Ao optar-se por cães Beagle com cerca de 2,5 anos de idade crê-se ter reunido as condições inerentes à fisiologia animal necessárias para o desenvolvimento de periodontite.

A localização dos implantes, no presente estudo, nas áreas correspondentes ao ₄PM₄ e ₁M₁, deveu-se a vários fatores. Tendo por base a experiência clínica da equipa medico-veterinária que acompanhou este estudo foi possível determinar a zona correspondente ao ₄PM₄ e ₁M₁ da mandíbula como sendo bastante propícia à acumulação de PB. Para além deste contributo resultante da experiência clínica também Lindhe *et al.*¹⁸², em

1973, apontaram as zonas posteriores como sendo as mais favoráveis para formar maiores agregados de placa bacteriana. De igual modo, uma revisão do modelo experimental canídeo para a investigação da peri-implantite, identificou a zona da mandíbula correspondente aos pré-molares e primeiro molar como sendo a mais utilizada para colocação dos implantes¹⁷⁹. A mesma revisão permitiu identificar os 10 mm como sendo a distância inter-implantes maioritariamente utilizada pelos diferentes grupos de investigação nesta área. Esta distância permite o desenvolvimento de defeitos peri-implantares sem que haja a junção de dois defeitos adjacentes com a inevitável perda da individualidade morfológica. De facto, o incorreto posicionamento dos implantes, não respeitando uma adequada distância entre os mesmos, pode acarretar a obtenção de defeitos peri-implantares unidos¹⁸⁵. Todos os factores atrás mencionados foram tidos em conta aquando da escolha da localização dos implantes no presente estudo experimental.

A maioria dos investigadores que utiliza o cão para estudos relacionados com a peri-implantite, após colocação dos implantes ou dos respetivos pilares de cicatrização, inicia um programa de controlo de placa bacteriana^{207, 208, 213, 214, 218, 220, 222, 223, 226, 239, 240, 244, 245, 252, 256}. Estas medidas de higiene, mantidas durante períodos de tempo variáveis, visam estabelecer condições favoráveis no ambiente peri-implantar para a adequada osteointegração dos implantes. No presente estudo, no grupo de implantes teste, não foi realizado qualquer controlo de PB após a colocação dos implantes, de modo a garantir uma contínua e crescente acumulação da mesma. A adoção desta metodologia foi de encontro a um procedimento realizado em 2011 por Schwarz *et al.*²²⁷ onde, após a extração dos 4 pré-molares bem como dos 1^{os} e 2^{os} molares bilaterais e em ambos os maxilares, durante 10 semanas não foi feita qualquer referência ao controlo da higiene oral tendo sido apenas administrados antibiótico e analgésico. Nos 7 dias após a colocação dos implantes mandibulares não-submersos não foi realizado qualquer controlo da placa bacteriana. Tendo em consideração que não foi referida pelos autores qualquer complicação pós-cirúrgica, esta ausência de controlo de placa bacteriana no período pós-extrações e pós-colocação de implantes não terá tido qualquer efeito sobre a normal evolução pós-operatória²²⁷.

O presente modelo experimental avalia o efeito da placa bacteriana sobre os tecidos peri-implantares. Desta forma pretende-se saber até que ponto a PB *per se* consegue induzir uma lesão peri-implantar compatível com a descrita na peri-implantite, mimetizando a ocorrência “natural” da peri-implantite.

Os modelos experimentais canídeos para estudar a peri-implantite não são consensuais entre os investigadores. Na literatura atual estão descritos basicamente dois modelos: um com perda óssea peri-implantar exclusivamente associada à colocação de ligaduras onde não é feita qualquer referência a um período de progressão da peri-implantite sem ligadura^{185, 209, 214, 220, 246-248, 308} e um outro com uma perda óssea peri-implantar inicialmente devida à ligadura mas com um período posterior de progressão espontânea da lesão sem recurso à mesma^{186, 231, 252, 254, 255, 257}.

A iniciação e progressão da peri-implantite é dependente da presença de um biofilme com determinados patogénios, nomeadamente elevadas proporções de anaeróbios Gram negativos³⁰⁹⁻³¹¹. Num estudo animal desenvolvido em 1992 por Ericsson *et al.*³¹² foi avaliada a resposta clínica e histológica dos tecidos gengivais dentários e peri-implantares a 3 meses de acumulação de placa bacteriana³¹². Para tal foram utilizados 5 cães Beagle com cerca de 15 meses de idade aos quais foi administrada uma dieta mole que permitisse a formação de placa bacteriana. Foram extraídos os pré-molares mandibulares direitos e colocados 3 implantes. Três meses após a colocação dos implantes foram colocados os pilares de cicatrização. Durante 4 meses, todos os dentes e pilares foram escovados uma vez por dia. Passado este período, terminou-se o programa de controlo de PB permitindo a subsequente formação de placa bacteriana e cálculos durante 3 meses. Após este período foi observada uma grande quantidade de placa bacteriana nos tecidos moles dentários e peri-implantares. Clinicamente estes apresentavam-se eritematosos, edemaciados e com ligeira hemorragia à sondagem. Histologicamente, resultante do edema, foi visível uma “bolsa” entre o implante/dente e a barreira de tecidos

moles adjacentes. Verificou-se igualmente que o infiltrado inflamatório celular resultante da acumulação de placa bacteriana apresentava uma extensão mais apical na mucosa peri-implantar do que na dentária. Assim, os tecidos moles dentários foram mais eficazes na prevenção da propagação mais apical da microbiologia presente na bolsa quando comparados com a mucosa peri-implantar. Apesar desta maior extensão apical do infiltrado inflamatório, não se detetaram sinais de reabsorção óssea ativa. Mesmo tendo em conta estes resultados clínicos e histológicos não se sabe se 3 meses de acumulação de placa bacteriana irão tornar os tecidos moles peri-implantares mais susceptíveis à peri-implantite³¹¹, bem como se, como e quando ocorrerá ou evolui da lesão dos tecidos moles para o tecido ósseo subjacente.

No presente estudo experimental o período de acumulação de placa bacteriana foi estendido a 17 semanas, ultrapassando em 5 semanas o estudo anteriormente referido desenvolvido por Ericsson *et al.*³¹². Para além deste acréscimo não foi realizado qualquer tipo de controlo de PB nas 16 semanas que antecederam a colocação dos implantes e durante esse período os animais foram igualmente alimentados com uma dieta mole, propícia à acumulação de PB. Assim, no presente modelo experimental, a acumulação de PB durante 16 semanas previamente à colocação dos implantes cria condições específicas para o desenvolvimento de um ambiente microbiano favorável ao aparecimento daqueles patogénios. Da mesma forma no presente estudo experimental foram utilizados animais não tão jovens, isto é em média com 2,5 anos de idade. Um protocolo experimental com animais de maior idade, bem como um maior período de acumulação de placa bacteriana, pode criar condições mais propícias para se observar alguma reabsorção óssea peri-implantar ativa. No entanto, tal como aconteceu com a observação histológica de Ericsson *et al.* (1992), também no presente estudo experimental não se observou histologicamente um processo ativo de reabsorção óssea. Assim, o contributo da acumulação peri-implantar de PB ao longo de 17 semanas, tal como observado por Ericsson *et al.* (1992) em 12 semanas, não parece ser suficiente para provocar uma reabsorção óssea peri-implantar ativa. Pode-se especular acerca da hipótese de se obterem resultados diferentes com a extensão significativa do período de acumulação de PB, bem como uma possível questão sobre o real contributo da PB para a iniciação e evolução desta patologia. De facto a causa bacteriana para o desenvolvimento das doenças peri-implantares, mucosite peri-implantar e peri-implantite, foi mencionada num relatório de consenso emanado do 6th EWP³, apesar de atualmente não ser consensual e haver alguma controvérsia científica à volta desta questão^{1,271}.

Através da análise da literatura crê-se que a formação de biofilme sobre os pilares de cicatrização e implantes é essencial para iniciar e perpetuar a progressão das doenças peri-implantares^{309,310}, estando esta acumulação supragengival de PB também dependente da rugosidade do pilar³¹³. No presente protocolo tal foi obtido com algumas das medidas acima mencionadas. Ao abdicar-se da colocação de ligaduras à volta do implante elimina-se a contribuição traumática²⁵⁵ para a evolução artificial da patologia peri-implantar²⁶⁰ e avalia-se a evolução dos tecidos peri-implantares devida apenas à presença de PB.

Todos os modelos experimentais canídeos que pretendem avaliar a patogénese e/ou tratamento da peri-implantite recorrem à utilização de ligaduras colocadas numa posição submarginal em torno do implante. O modelo experimental associado à investigação desta patologia é bastante heterogéneo em termos de tempo de permanência da ligadura, utilização de uma ou várias ligaduras alternadamente ou em conjunto e consequentes dimensões do defeito peri-implantar criado¹⁷⁹. De facto, em 1993, Grunder *et al.*¹⁸⁵, utilizando o modelo canídeo para criar defeitos peri-implantares com recurso à ligadura, obiveram defeitos horizontais. A ligadura foi introduzida no modelo experimental para induzir peri-implantite de forma crónica, desde a sua colocação no sulco peri-implantar até se obter o defeito peri-implantar com a dimensão desejada. Obtido esse defeito a mesma era retirada e a peri-implantite analisada ou tratada. Com a remoção da ligadura desaparecia o efeito traumático exercido pela mesma sobre os tecidos envolventes.

Apenas dois anos mais tarde, em 1995, Marinello *et al.* desenvolveram um estudo animal onde avaliaram as alterações tecidulares que ocorrem na peri-implantite, após remoção da ligadura. Para tal utilizaram 5 cães Labrador, com cerca de 1 ano de idade. Depois de extraídos os primeiros molares e terceiro e quarto pré-molares mandibulares bilaterais, foi permitida a cicatrização por um período de 3 meses. Posteriormente foram colocados 2 implantes em cada hemimandíbula. Três meses após colocação dos implantes foram colocados pilares de cicatrização. Após esta segunda etapa cirúrgica iniciou-se um programa de controlo de higiene oral através da escovagem diária dos dentes e implantes durante mais 6 meses. Terminado este período foi realizado um controlo clínico e radiográfico dos implantes. De seguida foram colocadas e forçadas ligaduras de algodão no sulco peri-implantar e os cães alimentados com uma dieta mole. O controlo da placa bacteriana foi abandonado. Após 4-6 semanas de utilização de ligaduras, e uma perda óssea peri-implantar de cerca de 25% relativamente ao osso original, estas foram removidas e manteve-se a ausência de controlo de placa bacteriana durante mais 3 meses. Dois cães foram eutanasiados 1 mês após a remoção da ligadura e os restantes 3 meses após.

A análise clínica e microscópica realizada 1 mês após remoção da ligadura revelou que os tecidos moles e mineralizados peri-implantares continham uma lesão inflamatória ativa e destrutiva. O infiltrado inflamatório estava em contacto direto com o tecido ósseo penetrando, na maioria dos implantes, na medula óssea. A crista óssea apresentava lacunas de Howship com numerosos osteoclastos. Pelo contrário, 3 meses após a remoção da ligadura, esta lesão, na maioria dos locais, tinha-se tornado inativa e encapsulada, confinada ao tecido conjuntivo lateral ao epitélio da bolsa (epitélio sulcular) e encontrava-se separada do tecido ósseo por um colar de tecido conjuntivo fibroso. Não foram detetados sinais de inflamação na medula óssea e apenas ocasionalmente se observavam osteoclastos. Em um dos três cães eutanasiados aos 3 meses, 3 dos 4 implantes perderam-se devido a contínua reabsorção óssea. O tecido ósseo remanescente nestes 3 locais bem como o tecido peri-implantar no quarto implante apresentava uma lesão “ativa” que envolvia tanto a mucosa como o tecido ósseo¹⁸⁶. Este estudo permite-nos afirmar que a utilização de ligadura numa zona peri-implantar durante 4-6 semanas e posterior ausência durante 1 mês histologicamente resulta numa lesão peri-implantar ativa. O infiltrado inflamatório associado a esta lesão encontra-se em contacto com o tecido ósseo peri-implantar. Pelo contrário 3 meses após a sua remoção, e apesar de a lesão estar previamente estabelecida, as características clínicas e histológicas da mesma caracterizam-se por uma lesão “inactiva” e encapsulada, confinada ao tecido conjuntivo lateral ao epitélio da bolsa e sem contactar o tecido ósseo.

Esta evolução permite-nos concluir que o processo inflamatório associado à lesão provocada pela ligadura tem uma remissão lenta podendo, nalguns casos, não ser autolimitada como atestado pela perda de 3 dos 4 implantes presentes num cão. Esta heterogeneidade da progressão da lesão peri-implantar poderá estar relacionada com o forçar da ligadura para uma posição apical. De facto os investigadores forçaram as ligaduras apicalmente, podendo este acto ter estado associado a distintas pressões e consequentemente acarretado diferentes posições da ligadura com diferentes evoluções da lesão. Desta forma não estamos presente um modelo animal que mimetize a situação clínica que pretende estudar.

Posteriormente, em 2004, Zitzmann *et al.*²⁵² publicam um artigo cujo objetivo foi estudar a presença e a progressão de lesões inflamatórias nos tecidos peri-implantares expostos a uma “peri-implantite experimental”. Foram analisados dois períodos na patogénese da peri-implantite, um induzido pela ligadura e outro não induzido por ligadura mas antes com uma progressão espontânea. Este grupo de investigação colocou 22 implantes nas mandíbulas de 5 cães. Foram colocadas ligaduras de algodão no sulco peri-implantar as quais foram trocadas a cada 2 semanas durante 2 meses e no final removidas, sempre com um controlo da placa bacteriana (período 1). Após remoção das ligaduras foi permitida a acumulação de placa bacteriana durante mais 12 meses (período 2).

No período 1 perdeu-se 1 implante. No período 2, em 16 dos 21 implantes remanescentes observou-se uma variável quantidade de perda óssea radiográfica, ocorrendo a perda de 2 implantes. Histologicamente as

abundantes lesões inflamatórias estendiam-se para apical do epitélio da bolsa, separando-se do tecido ósseo peri-implantar por uma zona de tecido conjuntivo aparentemente não inflamado. Não se observaram, ou quando presentes estavam apenas isoladamente, osteoclastos no tecido ósseo marginal. Assim não havia sinais de uma reabsorção óssea decorrente. Os resultados obtidos no final deste protocolo experimental estão de acordo com os obtidos em 1995 por Marinello *et al.*¹⁸⁶ pois ambos estudos observaram um infiltrado inflamatório separado do tecido ósseo por uma zona aparentemente não-inflamada de tecido conjuntivo. Tal como nos dois estudos anteriormente mencionados também no presente protocolo experimental não foram detectadas zonas de reabsorção óssea activa. No entanto a análise histológica qualitativa detectou na crista óssea adjacente aos implantes, a presença de estruturas histológicas compatíveis com lacunas de Howship.

Neste estudo de Zitzmann *et al.*²⁵², publicado em 2004, foi objectivamente identificado um período pós-ligadura, de progressão espontânea da lesão peri-implantar. Esta identificação objetiva de um período pós remoção da ligadura pretende mimetizar a progressão natural, humana, da peri-implantite. Este diferente modelo experimental marca um ponto de viragem em investigações futuras relacionadas com peri-implantite, não só para este como também para outros grupos de investigação. No entanto, também aqui o início da lesão peri-implantar foi realizado com recurso a ligaduras. Durante a sua utilização, entre os meses 0-2, cerca de 2,5-3mm do osso marginal foi perdido. Esta fase inicial do modelo experimental resultou da separação mecânica da adesão entre a mucosa e o implante e conseqüente acumulação de PB nesta localização submarginal tendo assim iniciado uma reacção inflamatória que envolveu não só a mucosa mas também o tecido ósseo. O contributo da ligadura para a iniciação e progressão da lesão peri-implantar foi notório se se comparar a perda óssea radiográfica ocorrida durante os 2 meses da sua utilização ($2,58 \pm 0,39$ mm) com a ocorrida nos restantes 12 meses após a sua remoção ($1,02 \pm 1,62$ mm).

Também neste estudo²⁵², tal como no de Marinello *et al.*¹⁸⁶, a progressão da lesão peri-implantar após a remoção da ligadura continuou em apenas alguns dos implantes. A razão para esta diferença ainda não é compreendida pela comunidade científica, mas pensa-se que pode estar relacionada com a localização do implante, microbiologia subgingival ou a qualidade da resposta do hospedeiro à infeção²⁵². No entanto nos resultados de Marinello *et al.*¹⁸⁶ no mesmo cão, com a mesma resposta do hospedeiro, perderam-se 3 dos 4 implantes. Outra questão referida no estudo de Zitzmann *et al.*²⁵² é o facto da ligadura ter provocado a separação mecânica mucosa-implante e conseqüentemente ter ocorrido a acumulação de PB no espaço subgingival, isto é primeiro criaram-se as condições físicas para a acumulação bacteriana subgingival e só depois é que esta se acumulou. No entanto, numa situação clínica de peri-implantite, a carga bacteriana tem um papel fulcral na sua etiologia³, e no modelo experimental atrás descrito a lesão peri-implantar prévia é que vai propiciar o estabelecimento da microflora naquele local. Deste modo não estamos presente um modelo animal que mimetize a situação clínica que se pretende estudar, questionando-se a sua adequabilidade bem como o potencial e extrapolação expectável para o ambiente clínico, preconizados por alguns autores^{176, 292}.

No presente modelo experimental não se criou previamente um defeito peri-implantar mas antes criaram-se condições microbiológicas que poderiam ser conducentes ao desenvolvimento daquele defeito. Desta forma pensa-se que se respeita a ordem biológica do estabelecimento da lesão peri-implantar.

Alguns anos após a publicação do modelo experimental anteriormente descrito²⁵², em 2007, Berglundh *et al.*²²⁴ desenvolveram um estudo de forma a utilizar aquele modelo experimental mas para avaliar a progressão de peri-implantite em implantes com duas superfícies distintas, nomeadamente polida (P) e “sandblasted acid-etched” (SLA). Após colocação dos implantes e durante 4 meses foi suspenso o controlo da placa bacteriana e colocadas ligaduras de forma a induzir uma peri-implantite experimental “activa”. Após a sua remoção manteve-se a ausência de controlo da placa bacteriana durante mais 5 meses. A perda óssea que ocorreu durante o período com ligadura foi semelhante em ambas as superfícies, enquanto que após a sua remoção

foi maior na superfície moderadamente rugosa (SLA) do que na polida (P). Os resultados obtidos no período com recurso a ligadura (“activa”) corroboram os previamente obtidos por Persson *et al.*²⁵¹, em 2001, onde a quantidade de perda óssea que ocorreu durante a fase “activa” foi semelhante na superfície polida (P) e moderadamente rugosa (SLA). Assim, de acordo com os resultados de ambos estudos, a influência da rugosidade da superfície do implante na presença de ligaduras de indução da peri-implantite experimental parece ser menor.

No entanto características que afectam a micro e a ultra-estrutura da superfície de implantes influenciam a adsorção e colonização bacteriana²⁴¹, sendo esta adesão superior em superfícies rugosas do que em polidas³¹⁴. Tal foi corroborado em 2007 pelo estudo de Berglundh *et al.*²²⁴ na medida em que a área da superfície do implante ocupada por placa bacteriana foi superior na superfície moderadamente rugosa do que na polida. Se, durante o período “activo” com recurso a ligadura, a perda óssea estivesse relacionada com a adesão bacteriana à superfície do implante, esta seria superior em superfícies moderadamente rugosas. No entanto foi semelhante em ambas superfícies muito provavelmente devido à ação traumática da ligadura.

No presente estudo experimental, no grupo de implantes não sujeito a escovagem, também foi visível a presença de placa bacteriana na superfície do implante, no entanto esta não se estendeu tão apicalmente quanto a verificada no estudo de Berglundh *et al.*, relativo ao ano de 2007, muito provavelmente devido à inexistência de uma destruição prévia dos tecidos peri-implantares pela ligadura que facilitaria a progressão apical da placa bacteriana. Pelo contrário, no grupo de implantes sujeito a escovagem, a análise histológica praticamente não permitiu observar a presença de PB na superfície do pilar e implante, corroborando-se desta forma a eficácia da escovagem no controlo da progressão apical da PB.

Como já referido o presente estudo experimental utilizou 6 cães. Uma das questões mais criticadas neste tipo de estudos experimentais é a ausência do cálculo da amostra a utilizar^{260, 315}. Tendo em conta a impossibilidade de realizar um estudo piloto, devido a questões financeiras, o cálculo desta amostra foi feito de acordo com uma revisão prévia da literatura existente. Para além desta revisão foi igualmente realizado o cálculo da potência e obtido o valor de 0,97, considerando um valor de significância de 0,05 e um teste paramétrico bilateral. Sendo o poder do teste a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa, no presente estudo a mesma foi de 97% (0,97) o que é considerado um valor bastante aceitável. De facto, no caso das ciências médicas, quando se assume um nível de significância de 5% é aceitável que o teste tenha um nível de potência de 80%³¹⁶.

Antes da realização de cada conjunto de avaliações (clínicas, radiográficas e microbiológicas) ao longo das várias semanas os animais foram regularmente anestesiados. A técnica anestésica realizada revelou-se eficaz para o procedimento realizado não tendo sido necessário recorrer a uma anestesia mais profunda, como a realizada para as extrações dentárias e colocação dos implantes. O motivo pelo qual não foi realizada esta técnica anestésica deveu-se ao facto das avaliações terem uma periodicidade de 3-3 semanas e desta forma se ter conseguido assegurar o bem-estar animal sem o sujeitar a cargas anestésicas maiores num curto espaço de tempo.

A variável presença de placa bacteriana (PPB) foi avaliada visualmente, de forma dicotómica, ao longo do procedimento experimental. A opção por este método e não pela utilização do revelador químico relaciona-se com o facto de, ao utilizar-se o revelador, ter-se que o remover após a sua quantificação pois a sua permanência poderia funcionar como um factor que alterasse a subsequente acumulação de PB. No entanto não conhecemos nenhum artigo que discuta a influência do revelador químico sobre a subsequente acumulação de PB. A remoção de PB corada identificada quimicamente pelo revelador de placa não se enquadrava no propósito do presente estudo pois foi intenção manter o máximo de PB em contacto com os tecidos peri-implantares do

grupo de implantes teste ao longo das 17 semanas de procedimento experimental. Da mesma forma, devido à importância de manter a PB na zona peri-implantar, não foi utilizado o Índice de Placa de Silness & Loe³¹⁷, publicado em 1964, uma vez que a sua identificação de acordo com diferentes níveis implica a passagem da sonda na margem gengival e consequente desorganização/remoção de PB. Por conseguinte, optou-se por utilizar uma variante simplificada do Índice de Placa^{281 cit in 282} determinando a presença (1)/ausência (0) visual de PB. Tal como no presente estudo experimental outros autores optaram por um registo dicotómico¹⁵⁶. No entanto poder-se-ia ter utilizado outro índice, também visual e adaptado para os implantes, mas que estabelece níveis distintos da quantidade de PB presente na superfície dentária/pilar^{318, 319 cit in 320}. Esta utilização permitiria dar-nos uma perspectiva da evolução da quantidade de PB ao longo do procedimento.

Para os implantes controlo verificou-se a sua presença apenas nas semanas 9 (n=9/48 faces; 18,75±15,54) e 15 (n=11/48 faces; 22,92±7,22) e em algumas faces, tendo havido uma diferença estatisticamente significativa ao longo do período experimental. Tendo em conta que este grupo de implantes foi escovado uma vez por dia, durante todos os dias do procedimento experimental, a possível justificação para a presença de PB poderá ser uma escovagem menos adequada em alguma(s) face(s) de alguns implantes. Apesar dos cuidados tidos pela equipa as possíveis dificuldades adicionais, derivadas do comportamento mais brincalhão do cão Beagle, poderão ter estado na origem da incorreta remoção de PB em alguns pontos. No entanto, esta presença também poderá ter resultado simplesmente de uma desatenção do membro da equipa durante este procedimento. A presença de PB, numa percentagem reduzida, não deve ter influenciado outros parâmetros ou, tendo havido uma influência, ela terá sido transitória já que não se verificou em duas observações sequenciais. No ser humano, a presença de PB em escassa percentagem não se traduz em significado clínico.

O cão Beagle é um animal de temperamento bastante dócil. Apesar de nos primeiros dias em que lhes foram escovados os pilares de cicatrização estes animais se terem manifestado pouco à vontade com os membros da equipa, posteriormente mostraram-se bastante colaborantes e inclusive brincalhões.

Houve uma preocupação por parte de todos os membros da equipa responsável pelo controlo da placa bacteriana dos animais, em dificultar a sua identificação individual por parte dos cães. Para tal, antes de estarem em contacto com os animais, todos os responsáveis pela escovagem vestiam o mesmo fardamento específico para a ocasião. Da mesma forma, não era aconselhado aos elementos usarem qualquer perfume mais intenso que permitisse a sua identificação imediata pelo cão, nem que conversassem antes, durante e após o procedimento. Este procedimento foi tema de debate antes do desenvolvimento do modelo experimental juntamente com os elementos da equipa veterinária, há muito habituados a lidar com estes animais, quer na prática clínica quer em investigação. O objetivo deste comportamento por parte da equipa foi uniformizar o comportamento dos cães a todos os elementos, não criando dificuldades adicionais a um ou outro membro, nomeadamente quando da escovagem dos implantes controlo.

Nos implantes teste verificou-se a presença constante de PB, não apresentando uma variação estatisticamente significativa ao longo do período experimental. Tendo em conta o registo dicotómico realizado não foi possível quantificá-la evolutivamente, uma vez que estes resultados apenas informam sobre a sua presença ou ausência. Por conseguinte, pode-se afirmar que três semanas após a colocação dos implantes e respetivos pilares já era visível a presença de placa bacteriana a qual se manteve até à semana 17. De facto a percentagem de faces com PB foi aumentando de forma gradual desde a semana 3 (72.9% das faces) até à semana 17 (81.25%), apenas com uma breve exceção na semana 12 (79.2%). Para além do aumento do número de faces com PB, clinicamente também foi visualizada uma maior quantidade da mesma.

De acordo com o publicado em 1989 por Quirynen *et al.*³²¹ 3 semanas são um período suficiente para a acumulação de placa bacteriana supragengival em dentes. Os resultados do estudo clínico realizado por aqueles autores concluem que a fase inicial de desenvolvimento de PB segue uma curva de crescimento exponencial,

com tendência a saturar às 96h. Após avaliação do padrão de crescimento da placa bacteriana verificaram que se desenvolvia a partir da margem gengival e quase sempre paralela a ela, numa direção oclusal. Estes resultados são corroborados por um recente estudo, publicado em 2013, de Dhir³²² que refere que as bactérias colonizam a superfície dentária 4 horas após a formação da película adquirida que recobre o dente. Os resultados de Quirynen *et al.*³²¹, apesar de obtidos num estudo clínico, permitem compreender a considerável acumulação de PB observada no presente estudo experimental às 3 semanas. De facto, neste estudo não houve diferenças estatisticamente significativas de PB ao longo do procedimento experimental muito provavelmente porque às 3 semanas já havia uma saturação da mesma. Em humanos, e de acordo o estudo anteriormente referido³²¹ esta saturação é atingida às 96h. Até à data não parece haver nenhum estudo que avalie a dinâmica de formação de PB em pilares de cicatrização num modelo experimental canídeo, havendo no entanto alguns focados na valiação das alterações dos tecidos moles devido à acumulação de PB nos pilares presentes naquele modelo animal^{252, 323-325}.

No presente estudo foi visivelmente notório o aumento da quantidade de PB ao longo das semanas. Este aumento, tendo sido observado mas não registado, poderá ter tido uma influência noutro(s) parâmetro(s) descrito(s). A utilização de um método para quantificar a PB, diferente do utilizado, poderia permitir analisar a evolução da sua acumulação e contribuir com informação adicional para este estudo.

Em ambos grupos de estudo foi notória a quase constante ausência de PB nas faces linguais dos pilares. A justificação para este facto relaciona-se com o frequente movimento da língua destes animais a qual toca naquelas faces dos pilares localizados nas posições ${}_1M_1$ e ${}_4PM_4$ e exerce uma ação mecânica de limpeza. No entanto, apesar de nas semanas iniciais estas faces não apresentarem PB, nas últimas semanas já se evidenciava fruto de uma acumulação ao longo do tempo e da eventual migração desde a margem gengival das faces adjacentes do mesmo pilar. A referida ação mecânica da língua, como força de remoção de microrganismos e impedindo a sua estagnação, já havia sido mencionada na literatura. Esse movimento impede a estagnação da PB e este mecanismo, juntamente com a adesão, favorece a sua retenção³¹⁴.

Os pilares de cicatrização utilizados em ambos grupos foram iguais e fabricados com o propósito de minimizar a acumulação clínica de PB, permitindo assim uma adequada cicatrização. A influência da rugosidade e da energia de superfície dos pilares na adesão da PB supragengival justifica a utilização de superfícies polidas e com baixa energia de superfície de modo a minimizar a sua adesão e consequente redução da ocorrência de inflamação dos tecidos adjacentes. Pelo contrário, as superfícies mais rugosas promovem uma formação e maturação da PB^{314,326}. Neste tipo de superfícies as bactérias estão mais protegidas contra as forças de cisalhamento e podem passar mais facilmente, e provavelmente mais frequentemente, de uma adesão reversível para uma irreversível. Adicionalmente, como demonstrado numa revisão de Quirynen *et al.*³¹⁴, uma superfície rugosa aumenta a sua área para adesão em 2-3 vezes. Da mesma forma, uma elevada energia de superfície permite uma maior adesão de PB. No entanto, o contributo da rugosidade parece sobrepor-se ao da energia livre de superfície³¹⁴.

Num estudo clínico foi confirmado que a acumulação de PB em áreas supragengivais estava significativamente aumentada em pilares com rugosidades mais elevadas³²⁶. No entanto, esta relação direta entre a rugosidade dos pilares e a adesão de PB não é consensual. Noutro estudo clínico desenvolvido em 2003 por Wenerberg *et al.*³²⁷ pretendeu-se avaliar se variações na rugosidade de pilares podiam provocar distintas respostas inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares após um período de *follow-up* de 4 semanas. Foram utilizados pilares com 5 rugosidades distintas. Foram incluídos nove pacientes no estudo, tendo cada um recebido um pilar de cada tipo, colocados na mandíbula durante 4 semanas. Apesar da PB visível ser ligeiramente superior nas superfícies com rugosidade mais elevada (1,0 μm e 1,9 μm), relativamente às superfícies com menor rugosidade (0,259 μm , 0,402 μm e 0,764 μm), os autores verificaram que não havia correlações estatisticamente significativas entre a rugosidade dos pilares e a quantidade de PB acumulada (peso em miligramas). Da mesma

forma os resultados histológicos obtidos apontaram para uma aparência bastante semelhante entre os tecidos peri-implantares de todos os pilares.

Tendo em conta os dados apresentados sobre a rugosidade, o presente estudo poderia ter beneficiado com a utilização de pilares de cicatrização de maior rugosidade, uma vez que o objectivo do grupo implantes teste foi obter a maior quantidade possível de PB na zona peri-implantar.

Da mesma forma a escolha do material para fabrico dos pilares pode ser determinante na acumulação da PB³²⁸ e na qualidade da barreira de mucosa peri-implantar³²⁹. Um estudo animal desenvolvido por Abrahams-son *et al.*³²⁹ concluiu que a escolha do material influencia a qualidade da adesão da mucosa peri-implantar ao pilar de cicatrização, sendo os materiais como o titânio comercialmente puro e a cerâmica os que permitem a formação de uma adequada barreira epitelial e de tecido conjuntivo. Quando o material utilizado era uma liga de ouro ou porcelana não se formou uma barreira epitelial adequada tendo havido recessão da margem gengival³²⁹. Recentemente, um estudo clínico avaliou a adesão bacteriana a pilares de diferentes materiais mas de igual rugosidade ($Ra=0,15-0,20\mu m$). Concluiu que a adesão de PB era inferior na liga de ouro-platina quando comparada com titânio, zircónio e hidroxiapatite³²⁸.

Tal como a rugosidade, o tipo de material poderá ser uma vertente passível de ser otimizada no sentido de se utilizarem pilares de cicatrização específicos para o desenvolvimento de modelos experimentais directamente relacionados com a acumulação de PB.

Em síntese, tal como esperado, a ausência de controlo de PB no grupo implantes teste ao longo de 17 semanas, permitiu a obtenção de valores de PB bastante superiores comparativamente ao grupo onde esse controlo foi realizado.

O método para registar a presença de mucosite peri-implantar (MPI) foi através do seu registo dicotómico, após confirmar ou não a sua visualização (sim/não; 1/0). Alguns autores utilizam métodos diferentes¹²⁶, enquanto outros não incluem sequer este parâmetro na sua avaliação clínica²²⁶. Todavia, tendo em conta o propósito deste estudo, será importante a sua avaliação pois a presença de inflamação nos tecidos moles peri-implantares, quando não tratada, é precursora de lesões mais graves (peri-implantite)¹⁴¹. A sua avaliação deverá ser feita de forma a não destruir ou desorganizar a placa bacteriana presente sobre a gengiva marginal peri-implantar. Deste modo, os sinais clínicos que caracterizam a inflamação, como a presença de eritema e/ou edema na gengiva marginal peri-implantar, foram avaliados visualmente.

Assim, relativamente à MPI verificou-se que para os implantes controlo ela apenas foi detetada na S12 ($2,08\pm 7,22$) mas de forma puramente pontual. Em termos absolutos este valor correspondeu à presença de MPI em apenas uma das 48 faces observadas ($n=1/48$).

Apesar de a inflamação da mucosa peri-implantar ser resultante da acumulação de PB, as faces dos pilares dos implantes controlo que apresentavam PB não registaram sinais clínicos de mucosite. A explicação para tal poderá residir no facto da quantidade de PB presente naquelas faces não ser suficiente para provocar inflamação da gengiva peri-implantar. Por outro lado, verificou-se a presença de mucosite na semana 12, na qual não tinha sido detetada PB. Esta inflamação da mucosa pode estar associada a um possível traumatismo que a gengiva peri-implantar tenha sofrido enquanto o cão se alimentava.

No grupo de implantes teste verificou-se que a presença de MPI foi aumentando desde a semana 3 até à semana 17. Este facto estará relacionado com o efeito cumulativo que a PB teve ao longo de todo o tempo experimental, como discutido anteriormente.

A observação de PB e a presença de inflamação dos tecidos peri-implantares observada no presente estudo foi igualmente verificada por outros investigadores^{312, 324, 330} referindo sinais visíveis de inflamação tais como eritema, edema e hemorragia à leve sondagem peri-implantar.

De facto, já num estudo clássico publicado por *Loe et al.*³³¹ foi demonstrada a relação causa-efeito entre a PB na junção dento-gengival e a inflamação gengival. Esta foi verificada em estudantes de medicina dentária, voluntários, que durante 3 semanas não controlaram a higiene oral, resultando na acumulação de PB e subsequente gengivite. A instituição do controlo da PB resultou no restabelecimento da saúde gengival.

Noutro estudo clínico, que avaliou implantes e dentes, *Pontoriero et al.*³³² compararam os parâmetros clínicos e microbiológicos durante o desenvolvimento de gengivite e mucosite peri-implantar. Foram incluídos vinte pacientes parcialmente desdentados com periodontite moderada a avançada, os quais foram devidamente tratados, reabilitados com implantes e colocados num programa periodontal de manutenção (3-3 semanas). Três e seis meses depois da colocação dos implantes, foram recolhidos parâmetros clínicos e microbiológicos nos implantes e dentes adjacentes. De seguida foi pedido aos pacientes para não controlarem a sua higiene oral durante 3 semanas, sendo posteriormente reinstituído o controlo da higiene oral e finalizada a reabilitação protética. Os resultados deste estudo apontaram para uma ausência de diferença entre os valores médios dos parâmetros clínicos analisados nos implantes e nos dentes. O período de ausência de controlo de PB demonstrou uma relação causa-efeito semelhante entre a acumulação de PB e o desenvolvimento de mucosite peri-implantar e gengivite³³².

Assim, tendo em conta a associação entre a presença de PB e a mucosite peri-implantar e o facto daquela se apresentar em maior quantidade de faces nos implantes teste, não será de estranhar que também a mucosite peri-implantar tenha tido um valor superior nos implantes teste relativamente aos implantes controlo, valor este estatisticamente significativo. Esta diferença é corroborada pelos resultados histológicos obtidos na S17, analisados mais à frente neste capítulo.

A profundidade de sondagem (PS) foi avaliada sempre pelo mesmo operador e foi avaliada apenas nas faces mesiais, distais e linguais. A ausência de sondagem na face vestibular deveu-se ao facto daquela face ter sido utilizada para a colheita microbiológica. Ao colocar uma sonda no sulco peri-implantar interfere-se com a flora microbiana aí presente o que poderia alterar a sua dinâmica de maturação, a sua quantidade e consequentemente a sua interação com os tecidos moles da bolsa peri-implantar. Na realidade, o simples facto de se realizar uma colheita microbiológica com um cone de papel acarreta a destruição de alguma da arquitetura tridimensional da comunidade microbiana presente numa bolsa periodontal ou peri-implantar²⁷².

A extensão de penetração da sonda periodontal no sulco peri-implantar é influenciada por factores como a pressão e ângulo de sondagem, diâmetro da ponta da sonda, forma e rugosidade do implante e resistência dos tecidos marginais¹⁰⁸. Assim, implantes que apresentem um colo divergente influenciam o correto posicionamento da sonda periodontal, tornando difícil a discussão sobre valores absolutos de PS quando nos referimos a diferentes marcas de implantes.

Relativamente à PS verificou-se que para os implantes controlo houve uma variação estatisticamente significativa ao longo do período experimental ($p < 0,001$). Esta diferença verificou-se principalmente entre a semana 3 e as restantes. Relativamente à progressão deste parâmetro clínico ao longo das várias avaliações consecutivas apenas se registou diferença entre a terceira e a sexta semanas ($1,08 \pm 0,15\text{mm}$ e $1,83 \pm 0,33\text{mm}$, respetivamente), não tendo havido qualquer diferença ao longo das restantes avaliações comparativamente à avaliação imediatamente anterior. Esta ausência de diferenças entre semanas consecutivas a partir da sexta semana poderá estar relacionada com a maturação da barreira de tecidos moles adjacentes ao implante. Num estudo animal realizado em 2007 por *Berglundh et al.*³³³, analisou-se a morfogénese da adesão da mucosa a implantes de titânio. Para tal foram utilizados 20 cães Labrador aos quais foram extraídos todos os pré-molares mandibulares e colocados 4 implantes por hemi-mandíbula. Os animais foram sujeitos a um controlo diário de higiene oral. A sua eutanásia deu-se em diferentes períodos temporais: às 2h, ao quarto dia 4 e uma, duas, quatro, seis, oito e doze semanas após a colocação dos implantes. Após análise histológica das amostras obtidas

concluíram que a barreira de tecidos moles adjacente aos implantes de titânio, colocados de forma não-submersa, desenvolveu as suas características histológicas finais num período de 6 semanas³³³. Estes dados podem auxiliar na compreensão dos resultados da PS para os implantes controlo uma vez que até à sexta semana, e de acordo com aquele estudo, os tecidos moles ainda não tinham estabilizado a sua maturação.

Relativamente à periodicidade da sondagem realizada e a possíveis efeitos lesivos sobre a mucosa peri-implantar, Etter *et al.*¹³⁰ realizaram um estudo animal onde avaliaram a cicatrização destes tecidos após uma sondagem padronizada. Após extração de todos pré-molares mandibulares em três cães “Foxhound” foram colocados 3 implantes de titânio e respetivos pilares em cada hemi-mandíbula. Foi realizado o controlo da placa bacteriana diário durante 10 semanas e após este período os pilares de cicatrização foram substituídos por cilindros de titânio especificamente produzidos para o efeito, permitindo o posicionamento exato da sonda periodontal calibrada. Sete, cinco, três, dois e um dia antes da eutanásia dos cães um dos 6 implantes em cada cão foi avaliado clinicamente. Os resultados demonstraram que uma sonda periodontal com diâmetro na ponta de 0,45mm e com uma pressão de 0,25N geralmente excedia a terminação apical do epitélio juncional, separando-o do implante, observando-se no entanto uma nova adesão epitelial após 5 dias, resultando na completa regeneração da mucosa peri-implantar¹³⁰. Por conseguinte, no presente estudo os controlos clínicos foram realizados com um intervalo de 3 semanas, o que permite um *restituto ad integrum* do complexo de tecidos moles peri-implantares. No entanto, e de acordo com os resultados de Berglundh *et al.*³³³, o início das avaliações clínicas poderá ter sido prematuro uma vez que ainda não estaria terminada a maturação dos tecidos moles peri-implantares.

Comparando os resultados do grupo implantes controlo do presente estudo com os do grupo controlo de Tilmanns *et al.*²¹⁰ (sem ligadura e com controlo de PB), verificou-se que, para uma análise aos 3 meses, os resultados de PS foram inferiores aos reportados por este autor. Contudo, nessa investigação foram avaliados 3 tipos distintos de implantes, todos diferentes dos utilizados no presente estudo, e obtiveram uma PS entre $2,70 \pm 0,50$ mm e $3,09 \pm 0,58$ mm. Estas diferenças podem estar relacionadas com as diferentes superfícies e geometrias dos implantes, nas sondas periodontais utilizadas bem como nas pressões de sondagem empregues.

Para os implantes teste verificou-se que houve uma variação estatisticamente significativa ao longo das semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17, nomeadamente entre a semana 3 e 9, 3 e 12, 3 e 15 bem como 3 e 17. Da mesma forma verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as semanas 6 e 9, 6 e 12, 6 e 15 bem como 6 e 17. No entanto, entre a semana 9 e as posteriores não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, verificando-se uma estabilização da PS. De acordo com os resultados de Berglundh *et al.*³³³ previamente descritos, a maturação dos tecidos moles peri-implantares ocorre às seis semanas. Da mesma forma, sabe-se que a acumulação de PB desencadeia a presença de uma população celular típica de um infiltrado inflamatório nos tecidos envolventes^{312, 324, 330, 332}. No presente estudo, ao contrário do que ocorreu nos IC, verificámos que a estabilização dos valores da PS para os implantes teste ocorreu apenas à nona semana e não à sexta, o que pode ser explicado por um atraso na maturação dos tecidos peri-implantares devido à presença de um componente celular típico do infiltrado inflamatório, decorrente da presença de PB e corroborado pelo valor percentual de MPI de 40%. Sabe-se igualmente que um aumento na PS pode estar relacionado com uma maior inflamação da mucosa peri-implantar³³², como verificado nos nossos resultados quer clínicos quer histológicos.

Comparando a observação clínica realizada na S17 e a presente descrição histológica qualitativa do córion peri-implantar realça-se uma maior quantidade de células inflamatórias e uma redução do componente colagénico nesta área. Tendo em conta que este desempenha uma importante função na manutenção da integridade estrutural desta área, assim se pode explicar a maior penetração da sonda periodontal a este nível^{115, 312}.

Num estudo de 2008 realizado num modelo animal, utilizando implantes com a mesma superfície que os do presente trabalho, Martines *et al.*²²⁶ avaliaram a reação clínica dos tecidos peri-implantares à peri-implantite

induzida por ligaduras. Após colocação dos implantes foi iniciado um programa de controlo da PB e quatro meses depois foram colocadas as ligaduras suspendendo-se o controlo da PB. A PS foi avaliada imediatamente antes da indução da peri-implantite bem como 30, 60 e 90 dias após colocação da ligadura. Na primeira avaliação o valor de PS foi aproximadamente 3,5mm verificando-se um aumento médio significativo da PS nos implantes SLA desde a primeira à última avaliação. Comparando o resultado da PS inicial com o obtido às 17 semanas no presente estudo ($2,44 \pm 0,38$) verificamos que aquele é superior. Uma vez que aquele grupo de investigação realizou uma sondagem com uma sonda igual à do presente estudo experimental, esta diferença pode estar relacionada com diferenças na pressão exercida por diferentes avaliadores bem como diferenças no desenho do implante.

Em síntese, as diferenças entre os implantes controlo e os implantes teste, no que diz respeito à profundidade de sondagem denota que a única variável entre ambos os grupos (controlo de placa bacteriana) terá tido um efeito sobre a ordem de grandeza deste parâmetro, sendo mais elevado nos implantes teste.

Relativamente à hemorragia após sondagem (HS) o método utilizado para registar a hemorragia foi aguardar 30 segundos após a sondagem da bolsa peri-implantar de forma a avaliar de modo dicotómico (sim/não; I/O) a sua presença no sulco peri-implantar. Este método foi igualmente utilizado por outro grupo de investigadores²²². No entanto, existem autores que na avaliação clínica dos tecidos peri-implantares não incluem este parâmetro^{210,226}. Para os implantes controlo a HS não apresentou uma variação estatisticamente significativa ao longo do período experimental. A média dos valores percentuais associados a esta variável manteve-se baixa, tendo sido na última semana (S17) de 0%. Estes valores reduzidos estão em concordância com os parâmetros de PPB e MPI. Tendo em consideração que a HS traduz a inflamação da porção apical da bolsa peri-implantar provocada por uma acumulação supra e posteriormente subgingival de PB, e que os valores de PPB neste grupo foram reduzidos, compreendem-se os baixos valores de HS registados neste grupo relativos a um reduzido número de faces, sem significado clínico. De facto como na HS o número de faces/implante avaliadas foi menor, relativamente a outros parâmetros onde se avaliaram as 4 faces/implante, a sua presença numa destas faces seria o suficiente para aumentar o seu valor percentual.

Para os implantes teste os valores de HS obtidos foram mais elevados quando comparados com os dos implantes controlo. À medida que se avançou cronologicamente no protocolo experimental estes foram aumentando, tendo atingido os valores mais elevados na 15ª e 17ª semanas. O efeito cumulativo da PB com a sua posterior migração apical e conseqüente inflamação, bem como o aumento da PS ao longo do modelo experimental, poderão estar na base da explicação destes valores. A HS representa a existência de uma inflamação subgingival, a nível da porção apical da bolsa peri-implantar, com considerável aumento do componente vascular. A percentagem de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo peri-implantar varia consoante o tecido esteja saudável ou inflamado, sendo o seu valor superior neste último caso^{115,312,324}. Na análise dos resultados histológicos do presente estudo foi possível observar o aumento do número e calibre dos vasos sanguíneos no córion peri-implantar dos implantes teste, traduzindo um estado de inflamação. A presença destas estruturas vasculares, aumentadas em número e calibre, decorrente de um estado de inflamação como conseqüência da acumulação de PB não parece ser influenciada pela superfície do implante³²⁴.

Por fim, importa realçar que o valor preditivo da HS relativamente às lesões peri-implantares é reduzido, sendo que a sua ausência indica a ausência de inflamação peri-implantar mas a sua presença não é sinónimo de ocorrência da mesma. De facto Ericsson *et al.*¹²¹ encontraram HS na maioria de implantes saudáveis, sujeitos a um controlo de PB, revelando que o valor preditivo da mesma como indicador de inflamação dos tecidos peri-implantares é questionável e relativo. A este propósito deve referir-se também um estudo clínico de Gerber *et al.*¹³³ onde foram incluídos 17 pacientes reabilitados com implantes. Estes pacientes encontravam-se a ser seguidos num programa de manutenção periodontal, apresentando-se numa situação clínica estável, sem infla-

mação dos tecidos peri-implantares. Estes autores concluíram que a sondagem peri-implantar é mais sensível que a periodontal e um aumento da pressão de sondagem de apenas 0,10 N (0,15N para 0,25N) pode provocar um aumento percentual de HS de 13,7% nestes pacientes. Segundo estes autores uma pressão de sondagem de 0,15N pode ser o limite para evitar falsos positivos.

Para avaliação do parâmetro nível da margem gengival (NMG) utilizou-se como referência o topo do pilar de cicatrização e a margem gengival, tal como o estudo de Warrer *et al.*²⁰¹. Também neste parâmetro não há um consenso entre autores, sendo que alguns utilizam outras referências como sejam o ombro do implante e a margem gengival²²².

Esta variável apresentou um aumento ao longo do procedimento experimental ($p < 0,05$), quer para os implantes controlo quer para os implantes teste, significando alguma retração da margem gengival. No início das avaliações (S3) realizadas neste modelo experimental não se verificou qualquer diferença entre os dois grupos. Este facto indicia que os tecidos peri-implantares de ambos grupos apresentavam condições de saúde semelhantes. Apesar da inflamação da margem gengival (MPI) apresentar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na S3, esta inflamação não se traduziu num edema tão exuberante que clinicamente tenha alterado a posição da margem gengival detectável através de mensuração com sonda periodontal. De referir ainda que todas as mensurações foram realizadas com base na aproximação ao 0,5mm mais próximo. Desta forma pequenas diferenças entre grupos não são mensuráveis. No entanto estas pequenas diferenças facilmente se podem mensurar com técnicas fotográficas normalizadas e medição com *software* adequado, pelo menos nas faces vestibulares e linguais. De facto, pelo menos para futuros estudos animais e clínicos de maior duração, esta metodologia poderá ser uma alternativa válida na medida em que será mais sensível a pequenas alterações da margem gengiva.

A variação do NMG entre a primeira e a última avaliação correspondeu, em valor médio, a 0,31 mm para o grupo implantes controlo e 0,29mm para o grupo implantes teste. Estes valores são reduzidos e com limitado significado clínico. Devemos ainda considerar que, tal como já descrito no parágrafo anterior, a aproximação do valor do NMG ao 0,5mm mais próximo, pode ter contribuído para imprecisões detectadas na análise estatística.

Num estudo experimental canídeo desenvolvido por Schwarz *et al.*²²² foram criados defeitos peri-implantares com recurso a ligaduras, tendo sido avaliados vários parâmetros clínicos entre os quais a recessão gengival (RG), medida desde o ombro do implante à margem gengival. Os autores utilizaram o mesmo implante que o utilizado no presente estudo e um pilar de cicatrização com 2 mm de altura. Após 3 meses de uso de ligaduras verificaram que a RG, num dos grupos testados, foi de $0,9 \pm 0,5$ mm. Como a referência utilizada foi o ombro do implante, a margem gengival estava cerca de 0,9mm para apical do mesmo. No nosso estudo o valor do NMG após 3 meses de acumulação de PB foi de $2,71 \pm 0,40$ mm, pelo que a margem gengival estava para coronal do ombro do implante, uma vez que a altura do pilar de cicatrização utilizado foi de 3,4mm. Assim, devido ao facto de se terem utilizado distintas referências num implante igual em ambos estudos, não são possíveis comparações diretas dos valores de RG ou NMG. A utilização da ligadura por Schwarz *et al.*²²² provocou não só uma perda óssea considerável como uma elevada inflamação e hiperplasia gengival, descrita pelos mesmos. Esta situação gengival vai camuflar a perda óssea subjacente. Este facto permite-nos questionar a utilidade do parâmetro RG (no presente estudo descrita como NMG). O parâmetro NMG poderá ser essencialmente mais adequado em implantes localizados em tecidos saudáveis (nomeadamente em zonas estéticas) uma vez que normalmente não se visualiza o ombro do implante. Da mesma forma em implantes “bone level” as referências margem gengival-topo coronal do pilar parecem-nos mais adequadas do que as utilizadas por Schwarz *et al.*²²². Assim, tendo em conta que na prática clínica normalmente não se visualiza o ombro do implante, a sua utilização como referência poderá não ser adequada, uma vez que para o identificar o clínico poderá ter dificuldade ou mesmo lesar os tecidos moles peri-implantares. A distância margem gengival-ombro do implante é também

utilizada em avaliações histológicas. Porém, tendo em conta que a técnica de preparação histológica está muitas vezes associada a alterações dimensionais dos tecidos a precisão deste parâmetro pode não ser elevada.

Outro fator a ter em linha de conta é o facto de para o cálculo médio da NMG termos contabilizado o seu valor nas 4 faces de cada implante. Ora, como já descrito, a face lingual apresentava-se quase sempre ausente de PB e MPI. Esta estabilidade na distância entre a MG e a face oclusal do pilar poderá ter contribuído para esta uniformização do NMG entre os dois grupos de implantes. Além disso a importância clínica deste valor poderá ser muito relativo em função da face em causa, nomeadamente por razões estéticas, de higienização e qualidade/quantidade da gengiva aderente adjacente.

Comparando o NMG entre ambos os grupos na S17 verificou-se a inexistência de diferenças estatisticamente significativas. Aparentemente este resultado não reflete a diferença estatisticamente significativa entre grupos, na S17, para o parâmetro PPB. A elevada PPB nos implantes teste na 17ª semana, comparativamente aos implantes controlo, não terá provocado um edema significativo da margem gengival.

Tal como nos parâmetros anteriores também o nível de inserção clínico (NIC) não apresenta referências padronizadas para a sua medição. Alguns autores utilizam como referências o ombro do implante e o porção apical da bolsa peri-implantar^{126, 185, 222} enquanto outros medem desde o topo do pilar de cicatrização à porção mais apical da bolsa peri-implantar^{201, 226}. De acordo com alguns autores este parâmetro clínico fornece o reflexo mais sensível do *status* peri-implantar, sendo a sua determinação um indicador confiável para o nível ósseo em torno dos implantes^{134, 210}.

O NIC registado no presente estudo corresponde à distância entre o topo do pilar e a extremidade da sonda periodontal, localizada no limite apical do sulco peri-implantar, não tendo sido medido clinicamente mas antes resultando da soma entre a PS e o NMG. Tal como para estes parâmetros, verificou-se o seu aumento ao longo do período experimental, tanto para os implantes controlo como para os implantes teste, apresentando geralmente estes últimos um valor estatisticamente superior. Porém nem sempre o seu aumento entre duas avaliações está associado a uma perda da inserção, pois se numa primeira avaliação estivermos perante uma situação clínica de gengivite com edema gengival, mas sem envolvimento do aparelho de inserção, e na medição seguinte aquele edema tiver desaparecido, este aumento de NMG não corresponde a uma perda de NIC. Interessa ter em consideração a sua variação cronológica e não tanto o seu valor absoluto.

Utilizando implantes distintos dos utilizados no presente estudo experimental, Lang *et al.*¹²⁶ determinaram o nível clínico de penetração da sonda periodontal em relação ao nível histológico do tecido conjuntivo, mucosa marginal e crista óssea alveolar em tecidos peri-implantares clinicamente distintos. Foram avaliados tecidos peri-implantares clinicamente saudáveis (com controlo de PB), com mucosite (sem controlo de PB) e com peri-implantite (ligadura e acumulação de PB). Em 5 cães Beagle foram colocados 3 implantes em cada hemimandíbula. Passados 2 meses os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo saudável, com controlo da PB; Grupo mucosite, sem controlo da PB; e Grupo peri-implantite, sem controlo da PB e com colocação de ligadura em torno dos implantes. Foram registados vários parâmetros clínicos na *baseline*, aos 2 e 4 meses. Aos 2 meses, no Grupo saudável e no Grupo mucosite o NIC foi de $3,74 \pm 0,32$ mm e $3,73 \pm 0,30$ mm respetivamente, sem diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Estes resultados não estão de acordo com os do presente estudo uma vez que, às 9 semanas, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre ambos grupos. No entanto há diferenças entre ambos modelos experimentais que devem ser referidas. No presente modelo experimental, aquando da colocação dos implantes já havia na cavidade oral uma quantidade de PB resultante da ausência do seu controlo durante as 16 semanas anteriores. Este agregado de PB poderá ter contribuído para um mais rápido estabelecimento e consequente maturação de uma microflora peri-implantar nos implantes teste, uma vez que apenas estes não foram escovados. Ao contrário do que ocorreu no presente estudo experimental Lang *et al.*¹²⁶ realizaram o controlo da PB antes da colocação dos implantes.

Outro factor que pode ajudar a compreender a diferença de resultados entre ambos estudos é o facto de no estudo anteriormente referido de Lang *et al.*¹²⁶ os autores terem utilizado o ombro do implante como referência bem como uma sonda de pressão controlada a qual aproximava o valor de medição ao 0,1mm mais próximo. No presente estudo a aproximação foi feita ao 0,5mm mais próximo o que pode ter contribuído para a obtenção de valores não tão fidedignos. O facto de ambos estudos utilizarem diferentes sistemas de implantes pode também estar na base da obtenção de diferentes resultados entre os mesmos. No “Grupo Peri-implantite” do estudo de Lang *et al.*¹²⁶ o valor de NIC obtido aos 4 meses foi $6,48 \pm 0,49$ mm. Esta diferença em relação ao valor obtido no presente estudo às 17 semanas ($5,17 \pm 0,52$ mm) deve-se ao uso de ligaduras as quais, tal como discutido no início deste capítulo, exercem uma ação traumática sobre os tecidos adjacentes levando a uma rápida e intensa resposta inflamatória, com consequentes alterações dos tecidos moles e duros peri-implantares.

Ainda de acordo com Lang *et al.*¹²⁶, as medidas do NIC são substancialmente influenciadas pela densidade do tecido conjuntivo em torno do dente. Os resultados do presente trabalho, aplicados a implantes e tendo por base uma análise histológica qualitativa, corroboram aquela afirmação pois ao fim de 17 semanas o grupo de implantes teste obteve um valor de NIC superior ao do grupo de implantes controlo ($p < 0,05$). Este resultado poderá estar relacionado com a constatação de que a percentagem de colagénio nos tecidos peri-implantares inflamados ser menor relativamente aos saudáveis^{115, 312}. De acordo os achados histológicos do presente estudo, os tecidos peri-implantares dos implantes teste apresentaram uma maior quantidade de infiltrado inflamatório.

Em síntese, a presença de uma diferença estatisticamente significativa entre o NIC de ambos grupos de implantes analisados, poderá estar mais relacionada com a PS do que com ao NMG, pois resultando o NIC do somatório daqueles dois parâmetros, e não havendo diferenças estatisticamente significativas entre ambos grupos para o NMG, a PS poderá estar na base daquela diferença.

No que concerne à supuração em nenhum dos grupos foi detectada a sua presença ao longo das múltiplas avaliações. No entanto, de acordo com algumas definições de peri-implantite nem sempre tem que haver supuração para se diagnosticar peri-implantite. De facto, no 7th EWOP, em 2010, a peri-implantite foi definida com níveis limiares de $PS \geq 5$ mm ou ≥ 6 mm e HS ou supuração. Desta forma a presença de pus após sondagem não é essencial para aquele diagnóstico clínico porém os autores referem que a sua presença é comum⁴. Da mesma forma vários autores incluem na definição clínica de peri-implantite a presença de pus^{11, 13, 18, 20, 25, 43, 87, 146, 147}, valorizando a sua presença enquanto critério de diagnóstico.

Ao longo do protocolo experimental os implantes controlo raramente apresentaram PPB. Da mesma forma praticamente nunca foi visível a inflamação dos tecidos peri-implantares, isto é de mucosite. Consequentemente, na observação histológica decorrente, não se observou uma elevada quantidade de infiltrado inflamatório nem ulceração da barreira epitelial peri-implantar. Por este motivo o reduzido infiltrado inflamatório presente com córion não invadiu o sulco peri-implantar com a consequente formação de pus.

Apesar de, nos implantes teste, histologicamente se ter verificado a ulceração do epitélio da bolsa e presença de infiltrado inflamatório no sulco peri-implantar, clinicamente não foi visível a presença de pus após sondagem do sulco peri-implantar. Isto deveu-se ao facto do processo infeccioso peri-implantar não ter sido tão exuberante que tivesse uma tradução clínica.

De acordo com uma revisão da literatura de Salvi *et al.*¹⁰⁸ a presença colectiva de células inflamatórias no tecido conjuntivo infiltrado pode explicar a presença de supuração em locais com patologia peri-implantar avançada. De facto esta conclusão vem corroborar resultados histopatológicos e imunohistoquímicos, de estu-

dos experimentais e humanos, de tecidos que rodeiam implantes com sinais de peri-implantite, i.e. com sinais de inflamação e perda óssea, que revelaram a presença de uma grande quantidade de infiltrado inflamatório celular^{156,334}. Piatelli *et al.*³³⁵ descreveram o infiltrado inflamatório presente na peri-implantite como sendo composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, no tecido conjuntivo que rodeia implantes com peri-implantite.

Em suma, no presente protocolo experimental, nalgumas lâminas pertencentes aos implantes teste, foi histologicamente observado a presença de considerável quantidade de células com perfil inflamatório. No entanto a sua quantidade não foi suficiente para apresentar tradução clínica.

A perda de osso marginal avaliada radiograficamente é uma variável crítica utilizada em implantologia e desde há muito proposta como um dos critérios para avaliar o sucesso dos implantes¹⁴⁹. O presente estudo experimental utilizou a técnica de paralelismo com recurso a um cone longo para aquisição das imagens de radiovisiografia. Esta técnica é amplamente aceite para a avaliação de alterações interproximais do tecido ósseo marginal em implantes^{108,145}.

O exame radiográfico do presente estudo experimental foi sempre realizado pelo mesmo operador, utilizando o mesmo aparelho radiográfico e sempre com uma guia radiográfica individualizada apoiada em quatro locais (caninos e segundos molares mandibulares), com o objectivo de padronizar todas as radiografias realizadas ao longo do estudo. No entanto, e apesar da utilização de uma guia radiográfica individualizada, como o cão não se encontrava anestesiado de forma tão profunda como no dia das extrações dentárias e colocação dos implantes, podem ter ocorrido pequenos movimentos do mesmo que tenham passado despercebidos ao operador.

Da mesma forma, a posição posterior dos implantes, a nível do 4º pré-molar e 1º molar, dificulta a colocação do suporte e respectivo sensor uma vez que este interferia com a zona mais posterior da língua, a qual naquela zona é mais volumosa e menos móvel. Estas características dificultaram ao operador o correto posicionamento do aparelho. A dificuldade em movimentar a língua muitas vezes exigia um esforço adicional para colocar e estabilizar o suporte do sensor no local correto. Estes factores poderão ter interferido com a manutenção precisa do ângulo do cone longo em relação ao sensor radiográfico e a capacidade de obtenção de uma imagem radiográfica perfeitamente sobreponível à inicial.

Um aspeto que não se conseguiu controlar foi a intensidade da corrente elétrica existente no bloco operatório. Apesar do aparelho radiográfico possuir um estabilizador de intensidade de corrente elétrica, verificaram-se alguns picos. Este fato pode ter estado na origem de alguma alteração na qualidade de algumas imagens radiográficas.

Na aquisição da imagem radiográfica tornava-se impossível ao elemento da equipa que a realizava não reconhecer os implantes teste devido à nítida presença de PB a envolver os pilares de cicatrização destes implantes, impossibilitando uma análise cega, o que no entanto, não deverá ter qualquer efeito significativo devido à forma como se procederam às medições a jusante deste procedimento.

Um outro aspeto que poderá ter influenciado a imagem radiográfica final foi a espessura da crista óssea que se encontra para lingual ou vestibular do implante. O facto de haver uma distância considerável entre a face lingual dos implantes e a parede lingual da mandíbula, aliada à eventual presença de pequenas angulações do cone longo em relação ao sensor, provocam uma imagem radiográfica onde aparentemente a margem da crista óssea se localiza para coronal ou para apical da sua real localização. A probabilidade de haver esta sobreposição será tanto maior quanto maior for a espessura das referidas paredes e a angulação do cone. Assim, para uma ligeira angulação do cone longo, quanto maior a espessura daquela parede óssea maior a interferência com a imagem

radiográfica. Neste caso, radiograficamente teremos uma crista óssea lingual sobreposta à posição da mesma a nível interproximal e, conseqüentemente, uma distância ODI-cOI que poderá não corresponder à realidade.

Por fim uma referência à posição final do implante após a sua colocação na mandíbula. Após as extrações dos pré-molares e molares mandibulares houve o cuidado de regularizar a crista óssea. O objetivo foi obter, dentro do possível, uma crista óssea o mais horizontal e plana possível, no entanto no dia da cirurgia de colocação dos implantes, se necessário, procedeu-se a uma ligeira e pontual regularização da mesma.

De forma a determinar a correta mensuração da distância ODI-cOI nas imagens radiográficas digitais pelo mesmo operador foram repetidas estas medições com um mês de intervalo entre elas. O teste à repetibilidade do processo de medição obteve um valor de correlação intra-classe muito forte ($cc = 0,998$; $IC95\% = [0,997;0,998]$; $p < 0,001$) mostrando uma elevada repetibilidade e denotando consistência nas mensurações realizadas (anexo – gráfico A).

Na análise dos resultados radiográficos verificou-se que na semana 0, momento correspondente à colocação dos implantes, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os IC ($1,21 \pm 0,49\text{mm}$) e IT ($1,22 \pm 0,35\text{mm}$) na distância entre o ombro do implante e o contacto mais coronal osso-implante, o que atesta o rigor e a uniformização na colocação vertical dos mesmos. Este resultado, sendo o único parâmetro analisado na S0, comprovou a percepção clínica relativa à inexistência de diferenças entre os implantes aquando da sua colocação. Este facto é essencial para que se verifiquem, *à priori*, condições idênticas para ambos os grupos eliminando possíveis vieses decorrentes da fase cirúrgica de colocação dos implantes. Da mesma forma a distribuição e identificação dos grupos experimentais, IC e IT, apenas foi feita após a cirurgia de colocação dos implantes e realização do exame radiográfico. A sua identificação foi aleatoriamente realizada por um elemento cego em relação à fase cirúrgica e controlo radiográfico.

Analisando a variação inicial S0-S3 para ambos grupos, IC e IT, verifica-se que apesar de valores médios distintos entre eles ($0,11\text{mm}$ vs $0,22\text{mm}$ respectivamente IC e IT) não houve diferenças estatisticamente significativas pois ambos grupos apresentam elevados desvios padrão, quando comparados com a respectiva média, o que não é de todo surpreendente dado a escala de valores em causa nesta fase mais precoce da avaliação.

Para o grupo IC verificou-se que a variação da perda óssea desde S0 até S17 foi de $0,70 \pm 0,51\text{mm}$, enquanto para os IT foi $0,81 \pm 0,47\text{mm}$. Para ambos os grupos esta variação foi aumentando desde S0 até S9, tendo-se posteriormente verificado uma estabilização da mesma. Esta variação poderá ser explicada pelos fenómenos da biologia da remodelação óssea. A osteointegração representa um processo dinâmico tanto durante o seu estabelecimento bem como durante a sua manutenção. No seu estabelecimento há uma relação delicada entre reabsorção óssea, nas zonas de contacto entre o corpo de titânio do implante e o tecido ósseo mineralizado, e a formação óssea nas zonas livres de contacto³³⁶. Aquele equilíbrio pode ser influenciado pela preparação do leito implantar, na medida em que a pressão que o implante exerce sobre o tecido ósseo está relacionada com esta preparação. O leito alveolar cilíndrico preparado no presente modelo experimental seguiu o protocolo do fabricante e utilizou o respectivo instrumental. Como resultado foram exercidas forças de torque leves pelas espiras do implante durante a sua colocação, exercendo-se assim uma pressão mínima sobre as paredes ósseas laterais do leito implantar. A necessidade da preparação de um adequado leito implantar, de forma a haver apenas forças de torque ligeiras durante a colocação do implante, já tinha sido referida por Berglundh *et al.*³³⁶. A resposta do tecido ósseo à colocação de implantes tem sido abordada por diversos autores. Em 2005, Berglundh *et al.*³³⁷ desenvolveram um estudo animal onde avaliaram o nível ósseo marginal após a colocação de implantes, de pilares e carga funcional, bem como as reações do tecido ósseo à carga funcional. Em 6 cães Beagle, após extração de pré-molares mandibulares e respectiva cicatrização, foram colocados 4

implantes de uma marca numa hemimandíbula (Astra Tech Implant System[®], Dentsply Implants, Sweden) e outros 4 implantes na hemimandíbula contralateral (Branemark[®] System, Nobel Biocare, Sweden), ficando todos submersos. Nesta altura foi realizado o primeiro controlo radiográfico (Fase 1 - *baseline*). Três meses depois foram colocados os respetivos pilares, iniciado um programa diário de controlo da higiene oral e realizado novo controlo radiográfico (Fase 2). Decorridos 3 meses após a colocação dos pilares foi cimentada uma ponte fixa, feita em ouro, sobre os caninos e pré-molares maxilares e foram colocadas próteses fixas parciais apenas sobre os 3 implantes mais posteriores de cada hemimandíbula. Nesta fase foi realizado mais um controlo radiográfico (Fase 3). Todos os animais permaneceram 10 meses com estes contactos oclusais tendo no final realizado novo exame radiográfico (Fase 4) e clínico. Após a eutanásia procedeu-se à análise histológica.

A perda óssea marginal, avaliada radiograficamente, ocorrida durante os 3 primeiros meses após colocação dos implantes foi de $0,12 \pm 0,19$ mm (implantes Astra[®]) e $0,53 \pm 0,18$ mm (implantes Branemark[®]). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Comparando com o presente modelo experimental, às 12 semanas (3 meses) verificou-se que, quer para os IC quer para os IT os resultados são superiores ($0,73 \pm 0,42$ mm e $0,67 \pm 0,62$ mm, respetivamente). Uma das explicações para esta diferença nos resultados poderá estar relacionada com diferenças no desenho, geometria e superfície entre os implantes utilizados bem como nas diferenças de protocolo cirúrgico e protético implementados.

Relativamente à influência que o desenho e a geometria dos implantes exercem sobre a remodelação óssea que ocorre imediatamente após a sua colocação não existe consenso. Abrahamsson *et al.*³³⁸ compararam a resposta dos tecidos peri-implantares, moles e duros, após a colocação de 3 sistemas diferentes de implantes. Em 5 cães Beagle colocaram 3 implantes de diferentes sistemas em cada hemimandíbula (Astra Tech Implants Dental System[®], Branemark System[®] e Bonelit[®] ITI System). Dos três sistemas utilizados dois foram colocados em duas fases cirúrgicas (submersos) (Astra Tech Implants Dental System[®], Branemark System[®]) e o terceiro em uma fase (não-submerso) (Bonelit[®] ITI System). Três meses depois foram colocados pilares nos implantes Astra Tech[®] e Branemark[®] e iniciado um controlo de PB. Foram realizados controlos radiográficos e após eutanásia as amostras foram processadas histologicamente. Concluíram que, desde de que a instalação dos implantes fosse corretamente realizada, a geometria do implante de titânio apresentava uma importância limitada sobre ambos tipos de tecidos peri-implantares. Porém, ao contrário do estudo de Berglundh *et al.*³³⁷, o qual fez a avaliação aos 3 meses, Abrahamsson *et al.*³³⁸ fizeram a sua avaliação histológica aos 9 meses, período que poderá ter mascarado anulado eventuais efeitos da geometria e desenho sobre os processos iniciais da osteointegração.

No que concerne à influência da superfície do implante na fase inicial da cicatrização óssea, em 2004 Abrahamsson *et al.*³³⁹ desenharam um estudo experimental com o objetivo de validar um modelo experimental anteriormente proposto por Berglundh *et al.*³³⁶ bem como avaliar a taxa e grau de osteointegração de implantes com superfícies maquinadas e SLA, durante as fases iniciais da cicatrização óssea. Todos os implantes apresentavam a mesma geometria e um colo polido supra-ósseo. Em 20 cães Labrador foram colocados aleatoriamente 2 implantes de cada superfície em cada hemimandíbula (2 SLA + 2 maquinados por hemimandíbula) numa totalidade de 160 implantes. Os cães foram eutanasiados 2h, 4 dias, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 semanas após a colocação dos implantes. Este grupo de investigação concluiu que a osteointegração aparentou ter sido mais rápida e com maior extensão na superfície SLA do que na maquinada.

Um outro factor que poderá ajudar a explicar as diferenças entre os resultados radiográficos de Berglundh *et al.*³³⁷ e os do presente estudo, é o facto de naquele estudo os implantes terem sido colocados de forma submersa nos 3 primeiros meses. Os implantes colocados no presente estudo experimental foram colocados de forma não-submersa. A influência da técnica submersa e não-submersa na integração dos tecidos

moles e duros peri-implantares foi abordada num estudo experimental canídeo de Abrahamsson *et al.*³⁴⁰, tendo concluído que ambas fornecem semelhantes condições de integração daqueles tecidos.

Após o desenvolvimento do modelo de progressão espontânea de peri-implantite por Zitzmann *et al.*²⁵², alguns investigadores desenvolveram estudos utilizando-o e analisando as reações tecidulares a implantes com a mesma superfície dos utilizados no presente estudo experimental.

Em 2007 Berglundh *et al.*²²⁴ estudaram a progressão da peri-implantite em implantes fabricados para o propósito (ITI® Dental System, Straumann, Suíça), com a mesma geometria mas com superfícies diferentes: SLA *versus* polida. Após um período de cicatrização de 3 meses foram colocadas ligaduras no sulco peri-implantar e abandonadas as medidas de controlo de PB. Após 4 meses de indução de peri-implantite com recurso a ligaduras e acumulação de PB as mesmas foram retiradas e manteve-se a ausência de controlo de PB durante mais 5 meses. Foi realizada a avaliação da perda óssea radiográfica ocorrida durante o período de indução com ligadura ($2,51 \pm 0,55$ mm vs. $2,27 \pm 1,05$ mm; SLA vs. polida, respetivamente) e durante o período de progressão sem ligadura ($1,12 \pm 1,07$ mm vs. $0,07 \pm 0,72$ mm, SLA vs. polida, respetivamente)²²⁴.

No ano seguinte àquele estudo, Albouy *et al.*²⁵⁴ realizaram um estudo com desenho experimental semelhante e analisaram a reação tecidular à formação de PB após a remoção de ligaduras em implantes comerciais expostos a peri-implantite. Na hemi-mandíbula de 20 cães Labrador foram colocados 4 implantes representativos de 4 sistemas com distintas superfícies (maquinado; TiOblast®; SLA®: TiUnite®). Após 3 meses de cicatrização foram colocadas ligaduras no sulco peri-implantar daqueles implantes e deixada acumular PB durante 3 meses. De seguida foram removidas as ligaduras e manteve-se a ausência de controlo da PB durante mais 6 meses. Tal como no estudo anterior foi realizada a avaliação da perda óssea radiográfica no período de indução com ligadura ($3,53 \pm 1,04$ mm; $4,19 \pm 0,63$ mm; $4,69 \pm 0,52$ mm; $3,58 \pm 0,37$ mm; para os maquinados, TiOblast®, SLA® e TiUnite®, respetivamente) e no período sem ligadura mas apenas com acumulação de PB ($1,84 \pm 1,41$ mm; $1,72 \pm 1,25$; $1,55 \pm 0,68$ mm e $2,78 \pm 1,91$ mm; para os maquinados, TiOblast®, SLA® e TiUnite®, respetivamente).

Em ambos os estudos acima descritos a perda óssea ocorrida nos implantes com superfície SLA, durante o período de utilização de ligaduras foi superior à obtida nos IT do presente modelo experimental. No estudo de Berglundh *et al.*²²⁴ a utilização de ligadura durante 4 meses provocou uma perda óssea radiográfica de $2,51 \pm 0,55$ mm a qual é bastante superior à que ocorreu nos IT do presente modelo experimental em 17 semanas ($0,81 \pm 0,47$ mm). Da mesma forma Albouy *et al.*²⁵⁴ obteve uma perda óssea radiográfica de $4,68 \pm 0,52$ mm durante 3 meses de progressão da lesão comparados com os $0,67 \pm 0,62$ mm obtidos pelo presente estudo no mesmo período de tempo.

Nos períodos de progressão sem recurso a ligaduras os valores de perda óssea radiográfica obtidos por aqueles investigadores continuaram a ser superiores aos do presente estudo: Berglundh *et al.*²²⁴ obteve $1,12 \pm 1,07$ mm e Albouy *et al.*²⁵⁴ $1,55 \pm 0,68$ mm. A explicação para esta diferença entre os valores obtidos por aqueles investigadores e os do presente estudo, utilizando o mesmo tipo de implantes, relaciona-se muito provavelmente com a presença da ligadura e respectiva ação traumática sobre os tecidos peri-implantares já anteriormente descrita.

Em síntese, no presente estudo experimental a presença de PB nos IT não promoveu uma perda óssea radiográfica adicional em 17 semanas, comparativamente à que ocorreu nos IC. O aumento da distância ODI-cOI até à S9 está de acordo com o processo biológico de modelação óssea ocorrido de igual forma em ambos grupos.

A microbiologia associada a lesões peri-implantares já foi estudada quer em ambiente clínico humano³⁴¹⁻³⁴⁷ quer em ambiente pré-clínico, animal^{163, 211, 238, 242, 348, 349}.

A escolha das espécies bacterianas pesquisadas neste estudo teve por base os resultados clínicos e pré-clínicos apresentados por vários autores^{163, 169, 211, 236, 242, 272, 349-353}. Durante a pesquisa bibliográfica que esteve na base da revisão da literatura presente na introdução desta dissertação, foi possível identificar várias espécies bacterianas mais comumente associadas à peri-implantite.

Vários estudos microbiológicos em humanos demonstraram que o biofilme associado a implantes com patologia peri-implantar difere substancialmente daquele presente em implantes saudáveis^{12, 341, 345}.

A análise de amostras microbiológicas provenientes de implantes com peri-implantite aponta para um domínio de bactérias Gram-negativas e, ocasionalmente, um elevado número de *Peptostreptococcus* (*P. micra*), *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. epidermidis*), *Enterococcus* e *Candida*^{272, 351}. Num recente estudo clínico, Tamura et al.³⁵⁴ sugerem que as bactérias periodontopatogénicas convencionais não são os únicos patogénios periodontais ativos na peri-implantite pois bastonetes anaeróbicos gram-positivos assacarolíticos também podem desempenhar um importante papel naquela patologia. Da mesma forma, num estudo clínico recente, de 2013, da Silva et al.³⁴⁷ descrevem que o biofilme associado a implantes com peri-implantite, quando comparado àquele presente em implantes saudáveis, apresenta mais bactérias do complexo laranja e outros patogénios “invulgares” como *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* e *Mitsuokella spp.*

São poucos os estudos clínicos^{352, 355} que comparam a microbiologia associada à mucosite e peri-implantite. Num desses estudos, Maximo et al.³⁵² utilizaram a “Checkerboard DNA-DNA hybridization” para analisar 40 espécies bacterianas provenientes de amostras de 13 pacientes com peri-implantite e 12 com mucosite. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Veillonella parvula* e *Actinomyces* foram detetados em níveis elevados nos casos de peri-implantite. *Capnocytophaga ochracea*, *Neisseria mucosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium spp.* e *Actinomyces* foram detetados em elevados níveis nos casos de mucosite.

Um outro estudo clínico desenvolvido por Shibli et al.³⁴¹ pretendeu relacionar a composição microbiológica do biofilme supra e subgingival, em pacientes com e sem peri-implantite. Avaliaram a presença de 36 microorganismos em 22 pacientes com peri-implantite e 22 pacientes portadores de implantes sem aquela patologia. Não foram encontradas diferenças substanciais entre o ambiente microbiológico supra e subgingival quer nos pacientes com peri-implantite quer nos pacientes saudáveis, no entanto o grupo peri-implantite apresentava maior quantidade de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*, quer supra quer subgingival. A marcada presença de espécies do complexo vermelho no biofilme supragingival dos implantes com peri-implantite sugere que este ambiente pode funcionar como reservatório para espécies patogénicas e contribuir para a re-infeção de locais subgingivais tratados³⁴¹.

O estudo da colonização inicial do biofilme subgingival representa um enorme desafio devido à falta de modelos que mimetizem a colonização subgingival ou que permitam uma recolha adequada de amostras³⁵⁶. Em 2005 Quirynen et al.³⁵⁷ desenvolveram um estudo clínico onde pretenderam avaliar o desenvolvimento inicial do biofilme em implantes com bolsas peri-implantares pouco profundas ($PS \leq 3\text{mm}$) e moderadas ($PS > 3\text{mm}$), estimando o tempo necessário para o estabelecimento de uma flora subgingival complexa tendo apenas como fonte de bactérias a área supragingival. A microbiologia não alterada dos dentes adjacentes dos mesmos pacientes serviu como controlo. As bolsas peri-implantares foram criadas após a inserção de pilares transmucosos em implantes previamente submersos e as colheitas microbiológicas foram realizadas após 1, 2 e 4 semanas. Nestes três períodos de avaliação foram encontrados valores médios superiores para algumas das bactérias colhidas nos dentes (subespécies da *F.nucleatum*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* e *P.gingivalis*), particularmente naqueles com $PS > 4\text{mm}$, comparativamente àquelas colhidas nos implantes. Quando apenas se consideravam

bolsas dentárias e peri-implantares mais reduzidas desaparecia a significância das diferenças. Concluíram que o desenvolvimento do biofilme subgingival é diretamente influenciado pelo ambiente supragingival.

Mais recentemente, em 2011, Mombelli & Decaillet²⁷² realizaram uma revisão da literatura relativa à microbiologia presente na periodontite e peri-implantite e concluíram, após análise de 29 artigos clínicos, que organismos presentes na periodontite crônica como *Fusobacterium spp.* e *Prevotella intermedia* eram regularmente detetados em situações de peri-implantite enquanto outros menos frequentemente detetados naquela patologia, como o *A. actinomycetemcomitans*, foram menos frequentemente associados com a peri-implantite. Estes resultados vêm corroborar parcialmente os de alguns artigos mais clássicos que apontam a elevada prevalência de bactérias como *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium spp.* na peri-implantite^{342, 350, 358}.

Para além dos estudos clínicos, vários estudos animais identificaram a presença de diferentes bactérias utilizando o modelo experimental de peri-implantite induzida por ligadura. No final do procedimento experimental foram detetadas *P. gingivalis*^{211, 236, 242, 349, 353}, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*^{242, 211, 353}, *P. nigrescens*, *T. forsythia*^{236, 349}, *Bacteroides oralis*¹⁶⁹, *Bacteroides fragilis*¹⁶⁹, *Fusobacterium spp.*^{242, 349}, *Streptococcus beta-hemolitico*^{242, 349}, *Campylobacter spp.*²⁴² e *Candida spp.* .

Nos modelos experimentais canídeos, a atenção dos autores centrou-se especificamente em espécies como a *Porphyromonas gingivalis*^{238, 211, 241, 253}, *A. actinomycetemcomitans*^{211, 238, 241}, *Prevotella intermedia*^{211, 238, 241, 242}, *Prevotella nigrescens*^{238, 241, 242}, *Prevotella spp.*²⁵³, *Bacteroides forsythus*²³⁸, *Fusobacterium spp.*^{241, 242, 253}, *Campylobacter spp.*²⁴², *Capnocytophaga spp.*²⁴², *Streptococcus beta-hemolitico*^{241, 242, 253} e *Candida spp.*²⁴¹.

Tendo em conta estes resultados microbiológicos optou-se por pesquisar no presente estudo experimental algumas das bactérias que poderão estar relacionadas com a peri-implantite.

No presente modelo experimental foi permitida a acumulação de placa bacteriana supragingival de modo *ad libitum*, tentando desta forma obter um mais rápido estabelecimento de um biofilme subgingival. Na superfície dentária o estabelecimento deste biofilme é dependente da sucessiva colonização por várias espécies bacterianas resultando numa microflora anaeróbica Gram-negativa complexa observada em locais periodontalmente comprometidos^{356, 359}. A relação entre o biofilme supra e subgingival peri-implantar foi definida por alguns estudos clínicos^{341, 357}, já referidos. Para além desta relação, também a velocidade de estabelecimento da flora subgingival foi já estudada. Em humanos, a microbiologia peri-implantar é rapidamente estabelecida após a colocação do implante e é amplamente influenciada e dependente da presença de dentes³⁶⁰. De acordo com Quirynen et al.³⁵⁷, um complexo microbiano subgingival peri-implantar desenvolve-se no espaço de 1 semana e segundo os resultados de um estudo clínico de Shibli et al.³⁴¹ o ambiente sub e supragingival não apresentam diferenças microbiológicas substanciais entre ambos. Isto verifica-se quer em pacientes sem patologia peri-implantar quer em pacientes com peri-implantite.

Aquando do desenho do presente modelo experimental optou-se pela extração de todos os pré-molares e 1º molar mandibulares bem como pela acumulação de PB durante 16 semanas antes da colocação dos implantes. A manutenção do 2º molar mandibular relaciona-se com a possibilidade deste dente, adjacente ao I-1M1 funcionar como reservatório de uma flora bacteriana supragingival. O mesmo princípio esteve na base na manutenção dos dentes antagonistas. Clinicamente, ao longo de todas as avaliações, foi verificado que a acumulação de cálculos e PB era superior nos dentes antagonistas relativamente ao 2º molar. Assim parece adequado assumir que o contributo, do ponto de vista bacteriano, dos dentes antagonistas foi superior ao do dente adjacente uma vez que aqueles apresentavam maior quantidade de PB e cálculos. A contribuição das bactérias presentes nos dentes para o desenvolvimento da lesão peri-implantar foi avaliada em alguns estudos. Estudos humanos sugerem que a infeção peri-implantar tem origem nas bactérias periodontopatogénicas que rodeiam os dentes naturais e a sua transmissão ocorre num período relativamente inicial^{361 cit in 259, 362}. Numa recente publicação relativa a um estudo clínico, Aoki et al.²⁵⁹ investigaram a associação entre a colonização do

fluido crevicular dos dentes naturais por bactérias periodontopatogénicas e a sua presença no sulco peri-implantar, de modo a clarificar a origem da colonização peri-implantar por essas bactérias. Foram colhidas amostras subgingivais em dentes adjacentes, antagonistas e contralaterais relativamente aos implantes. Revelou-se existir uma relação entre a deteção de *Aa*, *Pi*, *Pg*, *Td* e *Fn* no fluido crevicular de dentes adjacentes com o do sulco peri-implantar. Assim os autores concluíram que a colonização do sulco peri-implantar por *Aa*, *Pi*, *Pg*, *Td* e *Fn* era afetada pela presença destes microorganismos no fluido crevicular dos dentes adjacentes e não pela sua presença nos dentes antagonistas e contralaterais.

No presente modelo experimental os dentes onde, clinicamente, foi visível a presença de maior quantidade de PB e cálculos foram os molares antagonistas dos implantes em estudo. De acordo com Aoki *et al.*²⁵⁹ estes não são os dentes que mais contribuem para a colonização dos nossos implantes. Tendo em conta os resultados desta investigação, publicada após a realização do actual protocolo experimental, não foi no presente protocolo totalmente potenciada a colonização dos implantes teste por parte de uma flora propositadamente pré-estabelecida através da ausência de medidas de controlo de PB.

As diferenças na colonização dos implantes por bactérias provenientes de dentes adjacentes, em oclusão ou contralaterais pode estar relacionada com a distância desde o seu local original de infeção. A transmissão de microorganismos desde dentes adjacentes para um implante pode não necessitar da sua libertação desde o biofilme. Tal como descrito por Aoki *et al.*²⁵⁹ este biofilme supragengival por vezes funde diretamente com um biofilme presente num implante, sem competir com a PB aderida ao mesmo. Nestes casos a transmissão direta explica a elevada taxa de transmissão entre implantes e dentes adjacentes.

Um dos aspetos que poderia ter sido incluído no presente protocolo seria a análise microbiológica de amostras recolhidas nos dentes adjacentes e antagonistas relativamente aos implantes testados. Esta análise poderia clarificar algumas questões relacionadas com a origem da microbiologia presente na bolsa peri-implantar. No entanto, o objetivo microbiológico do presente estudo não estava centrado na origem mas sim na comparação da microflora entre dois grupos de implantes. Por outro lado restrições orçamentais obrigaram a fazer opções.

Apesar de o cão ser, há várias décadas, um dos modelos animais de eleição para estudos relacionados com periodontite ou peri-implantite^{156, 182}, são poucos os estudos sobre a flora microbiana subgingival predominante neste animal, não havendo um conhecimento detalhado da mesma. Recentemente Dahlen *et al.*²⁶⁶ realizaram um estudo onde foram avaliadas as espécies bacterianas predominantes no cão saudável, as quais foram fenotípica e genotipicamente comparadas com as espécies humanas correspondentes. Foram isoladas e caracterizadas 31 estirpes, das quais 28 eram anaeróbicas obrigatórias e 3 anaeróbicas facultativas (sendo todas estas *Pasteurella spp.*), representativas de 21 espécies diferentes, das quais 6 pertenciam ao género *Porphyromonas*. Estes resultados vieram confirmar os de alguns estudos anteriores^{236, 242}. Os autores concluíram que a flora subgingival canídea cultivável apresenta uma grande semelhança com a flora bacteriana subgingival humana a nível do género. Contudo há diferenças a nível da espécie *Streptococcus* e *Actinomyces*, as quais são regularmente encontradas nos humanos, não estavam entre as espécies predominantes no cão. Já a *Porphyromonas spp.* foi o género predominante no cão e a *Fusobacterium spp.*, *Filifactor spp.*, *Bacteroides spp.* (nos humanos a maioria das espécies *Bacteroides* foram reclassificadas noutras espécies, pertencentes ao género *Prevotella* e *Campylobacter*) estavam entre as bactérias predominantes. Da mesma forma Dahlen *et al.* (2012) chamaram a atenção para o facto de nenhuma das espécies ter sido isolada simultaneamente em todos os 6 cães e esta heterogeneidade deve ser tida em linha de conta quando se analisa a microbiologia numa situação experimental. Do ponto de vista microbiológico, estes resultados vêm corroborar a relação existente entre as estirpes bacterianas humanas e canídeas estabelecendo o modelo animal canídeo como um modelo adequado para estudos relacionados com a patogénese da periodontite e da peri-implantite.

Assim, a escolha do modelo animal canídeo para o presente estudo experimental, do ponto de vista microbiológico, revelou-se adequada.

A metodologia seguida no presente estudo experimental para recolha de amostras de biofilme subgingival consistiu na recolha, alternada, de amostras quer no implante posicionado na posição $1M_1$, quer na posição $4PM_4$. Ao se utilizar apenas um implante, por grupo experimental, diminuiu-se a quantidade de bactérias recolhidas. No entanto, tendo em conta que a técnica utilizada para identificação de bactérias (RT-PCR) é bastante sensível, tendo capacidade para detetar um pequeno número de células bacterianas³⁶³ esta aparente desvantagem foi ultrapassada. Acresce-se ainda o facto de, aquando da recolha se terem utilizado sempre dois cones de papel, tentando desta forma duplicar a amostra. O facto de se utilizar cones de papel, colocados no sulco peri-implantar, para colheita da amostra acarreta obrigatoriamente a destruição da organização espacial do biofilme que se desenvolve de forma natural. Assim, apenas se irão obter resultados relativos à presença de uma mistura de bactérias de locais inespecíficos do biofilme. Outra característica deste método de colheita é o facto de apenas recolher uma pequena fração do biofilme bacteriano presente no sulco/bolsa peri-implantar, podendo subestimar a presença de certas espécies³⁶⁴. No entanto, a utilização desta metodologia é amplamente aceite pela comunidade científica sendo largamente utilizada quer em estudos experimentais quer em estudo clínicos^{342, 350, 365, 366 344, 367}. Num recente artigo de revisão, onde foi descrita a microbiologia associada à peri-implantite em humanos, Mombelli & Decaillet²⁷² chamaram a atenção para o facto das colheitas bacterianas descritas nos 29 artigos incluídos, com exceção de um ³⁶⁸, recorrerem a métodos que destroem a estrutura tridimensional do biofilme. De facto neste estudo³⁶⁸ os implantes com peri-implantite foram removidos juntamente com os pilares e só depois as bactérias na sua superfície analisadas.

O presente modelo experimental avalia a evolução dos tecidos moles e duros peri-implantares associada à acumulação exclusiva de PB. Este facto contribui para uma dificuldade acrescida na comparação da microbiologia associada a ambos modelos, pois as condições inerentes a cada um dos mesmos são, *a priori*, distintas.

A metodologia utilizada para detetar e quantificar bactérias associadas à lesão peri-implantar não se encontra padronizada. Alguns estudos utilizam técnicas de cultura anaeróbica^{242, 253} enquanto outros utilizam a “polymerase chain reaction” (PCR)²³⁸. A metodologia utilizada no atual estudo foi a *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). A cultura microbiana é considerada o método de diagnóstico “gold standard” na deteção e identificação de novas espécies bem como quantificação dos microrganismos presentes na cavidade oral, sendo bastante específico na sua capacidade para distinguir espécies bacterianas³⁶³. No entanto, apenas deteta bactérias viáveis³⁶⁹, com capacidade de multiplicação, e, comparado com o RT-PCR, é consideravelmente morosa, onerosa e laboriosa. Da mesma forma, apresenta uma sensibilidade relativamente baixa e, caso as espécies requeiram condições especiais para o seu crescimento e estas não estejam presentes, o seu número será severamente subestimado. A PCR, desde que estejam presentes os *primers* apropriados, é uma técnica rápida e simples, com capacidade de detetar um pequeno número de células de uma determinada espécie. No entanto não fornece dados quantitativos. Esta limitação foi ultrapassada pela RT-PCR a qual se apresenta como uma técnica fiável e sensível, com capacidade para detetar um número reduzido de células bacterianas. Porém, tendo em conta que o DNA bacteriano necessita de ser extraído e isolado da amostra, torna-se igualmente laboriosa e onerosa. Apesar desta técnica ter sido descrita como bastante específica devido ao facto de utilizar *primers* específicos para cada espécie^{370, 371}, é possível que possam ocorrer reações cruzadas com outras espécies, desconhecidas, uma vez que a flora oral é não só extensa como também diversa. Finalmente esta técnica, tal como a PCR, não é adequada para detetar um elevado número de espécies bacterianas num elevado número de amostras³⁷², o que foi respeitado no presente estudo.

Depois de analisada e discutida a metodologia empregue passa-se à discussão dos resultados obtidos.

No presente estudo experimental, aquando da análise dos resultados obtidos em cada semana, por cão e para cada uma das espécies (anexo – tabelas I, J, L, M, N e O), quer para os IC quer para os IT, verificou-se a presença de uma considerável heterogeneidade entre animais. Assim, para a mesma espécie e no mesmo período, em alguns animais não se detetou qualquer quantidade de DNA enquanto para outros ela já foi detetada. Esta heterogeneidade relativamente à presença de DNA bacteriano nos cães analisados foi igualmente mencionada em 2012 por Dahlen *et al.*²⁶⁶, aquando da colheita microbiológica realizada em pré-molares maxilares de cães Labrador. Este resultado pode ser surpreendente tendo em conta que os cães tinham praticamente a mesma idade e foram criados no mesmo ambiente, com os mesmos fatores alimentares e ambientais. Por outro lado, é possível que todos os cães tenham as mesmas espécies bacterianas, apesar de não detetadas na flora predominante. Por fim, e apesar da RT-PCR ser uma técnica bastante específica, é concebível a ocorrência de reações cruzadas com outras espécies bacterianas, ainda desconhecidas, pois a flora oral é extensa e diversa³⁷³. De acordo com aqueles autores²⁶⁶ esta heterogeneidade deve ser tida em linha de conta aquando da análise dos resultados microbiológicos em situações experimentais.

Analisando a presença das diferentes bactérias desde o início até ao final do protocolo experimental, nos implantes controlo, praticamente nenhuma apresenta diferenças estatisticamente significativas entre a primeira e a última colheita. De facto, as únicas exceções foram as Bactérias Totais quantificadas nos IC-₄PM₄, o género *Streptococcus* presente nos IC-₁M₁ e a *Pg* quantificada nos IC-₁M₁. Esta ausência de variação com certeza estará relacionada com o facto destes implantes terem sido sujeitos a um controlo diário da PB através da escovagem. Assim, foi possível controlar a acumulação supragengival de placa bacteriana e desta forma a consequente colonização subgengival.

Relativamente à quantificação das Bactérias Totais o seu valor diminuiu entre a S6 e a S17. À medida que o protocolo experimental foi avançando é possível que a equipa responsável pela escovagem dos implantes tenha melhorado a técnica no sentido de o fazer da forma mais eficaz, também fruto da maior colaboração dos cães devido ao trato diário. De facto, apesar da PPB não se ter alterado entre S3 e S17, verifica-se que a HS diminuiu entre ambos períodos avaliados. Esta diminuição traduz uma menor inflamação da zona mais profunda da bolsa peri-implantar devido a menor colonização bacteriana.

Por sua vez o *Streptococcus spp.* obteve na S15 a quantificação do seu DNA mais reduzida. Esta menor quantificação, obtida 15 semanas após o início do período experimental, pode estar relacionada com a maturação do biofilme subgengival. De facto, correlacionando os resultados obtidos para a *Streptococcus spp.* com o parâmetro clínico PPB verificamos que na S15 o valor para a PPB foi o mais elevado ao longo de todo o procedimento experimental. Esta elevada quantidade de placa bacteriana detetada na S15 pode estar associada a uma maior maturação da mesma e consequente menor quantificação de colonizadores iniciais como *Streptococcus spp.* Acresce ainda que a *Streptococcus spp.* foi a espécie mais detetada na primeira colheita, realizada na S3. Esta prevalência pode ser explicada pelo facto deste patógeno ser um colonizador inicial das superfícies³⁵⁶ bem como ser capaz de produzir bacteriocinas inibidoras de bactérias patogénicas, atrasando desta forma o seu aparecimento³⁷⁴. À medida que se vão estabelecendo relações de co-agregação específicas com outras espécies, o número destas aumenta ao longo do período experimental³⁵⁶.

A outra variação estatisticamente significativa neste grupo diz respeito à presença da *Pg* nos IC-₁M₁. Os implantes controlo foram sujeitos a um controlo diário de PB, no entanto da análise dos resultados clínicos verificou-se que na S15 o parâmetro PPB atingiu o seu valor percentual mais elevado. Este aumento na placa bacteriana supragengival, verificado na S15, pode estar na origem do valor mais elevado de *Pg* encontrados no mesmo período. Esta relação entre a flora microbiana supra e subgengival foi já estabelecida por alguns autores. Numa revisão da literatura, Socransky & Haffajee³⁵⁹ concluíram que o estabelecimento de uma flora microbiana subgengival dependia da sucessiva colonização da superfície dentária por diferentes espécies bac-

terianas. Outros autores^{345, 356} concluíram que a formação inicial de biofilme na superfície de implantes era semelhante à que ocorria em dentes naturais e materiais restauradores. O aumento de PB supragengival irá contribuir para esta colonização da superfície implantar com o consequente aumento da detecção de DNA de *Pg*.

Da mesma forma, a presença de *Pg* em maior quantidade na S15 e nos IC-M₁ pode estar relacionada com o facto deste implante ser adjacente do segundo molar mandibular e estes dentes contribuirão para a flora microbiana presente no sulco peri-implantar. De acordo com os resultados de Aoki *et al.*²⁵⁹ a colonização do sulco peri-implantar por espécies bacterianas como *Aa*, *Pi*, *Pg*, *Td*, *Tf* e *Fn* é afetada pela presença destes microrganismos nos dentes adjacentes e não pela sua presença em dentes antagonistas ou contralaterais, como já referido anteriormente.

Num estudo clínico realizado por Socransky *et al.*²⁶⁵ a *Pg* apresentou uma elevada correlação com a PS e HS, encontrando-se aumentada em prevalência e número com o aumento de ambos os parâmetros. Quer a PS, quer a HS, apresentaram um aumento estatisticamente significativo entre S3 e S15, o que pode justificar o aumento da quantificação da *Pg* entre ambas avaliações. No entanto, estes autores referem que a presença de *Pg*, uma bactéria estritamente anaeróbia, é mais notória em bolsas superiores a 4mm, valor que não foi obtido no presente protocolo experimental.

Analisando a presença de DNA bacteriano nos implantes teste ao longo das semanas, verifica-se que, com exceção da colheita de *Aa* nos IT-₄PM₄, nenhuma das restantes bactérias apresenta uma variação estatisticamente significativa ao longo do procedimento experimental. Da mesma forma, e apesar da inexistência de diferenças estatisticamente significativas, todas as bactérias sofreram um aumento entre a primeira e a última colheita. A única exceção foi a ligeira redução, sem significado estatístico, da *Streptococcus spp.* colhida nos IT-₁M₁.

De acordo com estes resultados podemos afirmar que, de uma forma geral, não se verificou um aumento significativo da carga bacteriana ao longo do procedimento experimental. Isto indica que na altura da primeira colheita microbiológica, às 3 semanas, os implantes teste já apresentavam uma microflora estabelecida. De acordo com o estudo clínico de Quirynen *et al.*³⁵⁷, já referido, a flora subgengival peri-implantar estabeleceu-se em apenas 1 semana. Esta microbiologia estabelece-se nas bolsas peri-implantares quer reduzidas quer moderadas, tendo apenas o ambiente supragengival como fonte bacteriana.

Assim, a primeira colheita no presente estudo, 3 semanas após a colocação dos implantes, de acordo com os resultados daqueles autores³⁵⁷ avalia já uma microflora subgengival peri-implantar complexa. Porém, apesar desta influência, o desenvolvimento do biofilme subgengival pode apresentar um distinto padrão de maturação devido às diferenças entre os ambientes supra e subgengivais³⁵⁶. Esta possível diferença na maturação e o facto de o *Aa* ser um colonizador tardio podem estar na base das diferenças estatisticamente significativas obtidas para o *Aa* colhida nos IT-₄PM₄ do presente estudo experimental. No entanto deve ser referido que o valor de *p* obtido foi próximo do nível de significância de 5% ($p=0,041$).

Um dos motivos que pode justificar esta inexistência de variação estatisticamente significativa na carga microbiana, desde a S3 até à S17, relaciona-se com o facto de neste modelo experimental não se ter conseguido obter bolsas peri-implantares com uma PS compatível com o diagnóstico de peri-implantite, isto é superiores a 4-5 mm. De acordo com alguns estudos clínicos realizados em pacientes saudáveis e com periodontite existe uma relação direta entre a presença de espécies bacterianas e a profundidade da bolsa sendo que a abundância e prevalência daqueles aumenta com o aumento da profundidade da bolsa periodontal^{265, 375}. Tendo em conta a semelhança entre a colonização das bolsas periodontais e do sulco peri-implantar²⁵⁹ bem como o facto de a PS do sulco peri-implantar se encontrar em valores não patológicos, não será de estranhar que os patogénios detetados nos IT não tenham sofrido uma variação estatisticamente significativa ao longo do tempo.

Comparando os resultados obtidos para as diferentes variáveis entre os implantes teste e os implantes controlo verificamos que para as Bactérias Totais, *Fusobacterium spp.*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* houve

uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos no final do protocolo experimental, obtendo os IT o valor mais elevado. Esta diferença poderá estar relacionada com o facto do controlo supragengival de PB nos IC, não permitir a acumulação daquelas espécies a nível subgengival, sendo esta característica corroborada por estudos de microbiologia quer em pacientes portadores de bolsas peri-implantares^{341, 357} quer em pacientes portadores de bolsas periodontais³⁷⁶.

A inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos para a *Streptococcus spp.* pode estar relacionada com o facto destas bactérias serem colonizadores iniciais das superfícies, sobre os quais aderem posteriormente outras bactérias como a *F. nucleatum* e apenas mais tarde estes co-agregam com bactérias como a *P. gingivalis*. A capacidade do género *Streptococcus* aderir a superfícies não abrigadas, o facto de serem menos sensíveis ao oxigénio que a maioria das bactérias orais bem como a particularidade de co-agregarem extensivamente com outras bactérias do mesmo género, confere-lhes uma grande vantagem e permite-lhes constituir 60-90% da flora microbiana inicial³⁵⁶. De facto no presente estudo experimental a *Streptococcus spp.* foi a mais prevalente na S3.

Vários estudos apontam para o domínio do género *Streptococcus* na formação inicial de placa bacteriana supragengival, sendo que entre 4 a 8h após a sua formação este género pode constituir 86%³⁷⁷ das bactérias isoladas³⁷⁸⁻³⁸⁰.

Tendo em conta que no desenho do presente modelo experimental os cães do grupo IC terem sido sujeitos a um controlo da placa bacteriana apenas 24h após a cirurgia, este período de tempo terá sido suficiente para o estabelecimento daqueles colonizadores iniciais, primeiramente no biofilme supragengival e depois no sulco peri-implantar, tornando assim a sua deteção possível. No entanto, devido à escovagem diária dos IC, o biofilme subgengival nunca atingiu um estado de evolução tal como ocorreu nos IT.

Tillmanns et al.²¹¹ monitorizaram a microbiologia e a progressão radiográfica e histológica de peri-implantite induzida por ligadura, concomitantemente com o abandono de medidas de controlo de PB. Utilizando sondas de DNA, reportaram um aumento das bactérias *Aa*, *Pi* e *Pg* no final do período experimental (6 meses). A presença de *Aa* não foi detetada no início do protocolo (*baseline*) e aos 6 meses a sua prevalência foi baixa (inferior a 4%).

Por sua vez, Nociti et al.²³⁸ recorrendo ao mesmo modelo e utilizando a PCR. Não detetaram *Pg*, *Bacteroides forsythus* (*Bf*), *Aa*, *Pi* e *P. nigrescens* no dia 0 (*baseline*) e nem 1 mês após indução da peri-implantite, tendo apenas detetado a *Pg* e *Bf*, em 95% e 80% dos implantes, respetivamente.

Já Shibli et al.²⁴¹ analisaram, em diferentes superfícies de implantes a presença de *Pg*, *Aa*, *Pi/P. nigrescens*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Candida spp.* e o número total de bactérias, recorrendo à técnica de cultura anaeróbica. Estas bactérias foram analisadas nos dias zero (*baseline*), 20, 40 e 60 após colocação da ligadura. A espécie *Capnocytophaga* e a *Aa* não foram detetadas em nenhuma das colheitas realizadas em qualquer período experimental. Na primeira colheita (*baseline*) não foi detetada *Pg* e as espécies *Campylobacter* e *Candida* apenas foram detetadas em reduzida proporção. Após a indução de peri-implantite, o número de todos patogénios aumentou, no entanto apenas a *Pi/Pn*, *Fusobacterium spp.* e *Streptococcus beta-hemolítico*, tiveram uma variação estatisticamente significativa ao longo do período experimental mas não em todos os tipos de superfície de implantes. As bactérias mais prevalentes aos 60 dias foram *Pi/Pn*, *Fusobacterium spp.* e *Streptococcus beta-hemolítico*.

Hayek et al.²⁵³ analisaram a presença de *Pg*, *Aa*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* e *Streptococcus beta-hemolítico* na bolsa peri-implantar resultante da ação de ligaduras e sem controlo da PB (4 meses com ligadura e 4 meses com progressão espontânea sem ligaduras), por técnica de cultura anaeróbica. Nas colheitas realizadas imediatamente após término do período de indução de peri-implantite, e antes do tratamento das respetivas

bolsas, não foram detetadas *Pg* e *Aa*. As restantes espécies foram detetadas na ordem aproximada de 10^5 - 10^6 CFU/ml, sem diferenças estatisticamente significativas entre elas.

Mais recentemente, em 2013, Charalampakis et al.³⁴⁸ analisaram o perfil microbiológico em torno de dentes e implantes após a remoção de ligadura em cães sujeitos a periodontite e peri-implantite experimental. Após um período de indução de periodontite e peri-implantite de 10 semanas e acumulação de PB, as ligaduras foram removidas. Foram realizadas colheitas imediatamente após a sua remoção, bem como 10 e 25 semanas depois, e analisadas por “checkerboard DNA-DNA hybridization”. Foram utilizadas 16 sondas de DNA, 14 específicas para cães e 2 humanas. Os autores concluíram que a carga microbiana total aumentou após a remoção da ligadura. Imediatamente após a remoção da ligadura as bactérias mais prevalentes nos implantes foram *Porphyromonas spp*, *Porphyromonas canoris*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas stomatis* e *Porphyromonas cangingivalis*. No entanto, 25 semanas após a remoção da ligadura as cinco bactérias mais prevalentes foram a *Treponema denticola* (humana), *P. cangingivalis*, *P. canoris*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas crevioricanis*. Os autores verificaram a existência de uma grande variação relativamente aos perfis microbiológicos, o que torna a interpretação de uma correlação entre a progressão da doença e perfis microbiológicos bastante difícil. Da mesma forma as colheitas microbiológicas efetuadas por estes autores foram realizadas apenas num único cão, o que pode enviesar os resultados na medida em que, como já descrito e corroborado pelo presente estudo experimental, nem todos os cães apresentam a mesma flora. Contudo, comparando estes resultados com os do presente estudo verificamos a presença elevada do género *Porphyromonas*, nomeadamente da *P. cangingivalis*. Todavia, não é possível saber se esta bactéria corresponde à *Pg* detetada no presente estudo pois a utilizada por Charalampakadis et al.³⁴⁸ estava identificada através de um “culture collection number from University of Gotemburg” (CCUG) e não pela sequência de primers utilizada e que identifica a bactéria em estudo.

Comparando os resultados dos estudos atrás mencionados com os obtidos nos IT do presente procedimento experimental encontramos algumas diferenças. Nos IT do atual estudo verificou-se que na S17 foram detetadas todas as bactérias pesquisadas, isto é *Fusobacterium spp*, *Streptococcus spp*, *Pg*, *Aa* e *Pi*. De entre estas a *Fusobacterium spp* e *Pi* foram as espécies menos detetadas no fim do período experimental ($0,003 \pm 0,001$ e $0,006 \pm 0,010$ µg (DNA)/ml, respetivamente), o que não corrobora os resultados de Shibli et al.²⁴¹ pois no procedimento experimental deste grupo de investigação ambas bactérias pertencem ao grupo das bactérias mais prevalentes.

Relativamente ao *Aa* no presente estudo a sua concentração aumentou desde S3 até S17. Este resultado não está de acordo com os estudos de Shibli et al.²⁴¹ e Nociti et al.²³⁸ pois estes grupos de investigadores não detetaram aquela bactéria em qualquer altura do procedimento experimental. Da mesma forma, Hayek et al.²⁵³ não detetaram *Aa* após 4 meses de indução de peri-implantite com recurso a ligadura e outras 4 de progressão espontânea. No entanto, o aumento de *Aa* verificado no presente estudo foi igualmente reportado por Tillmanns et al. (1998), porém não detetaram aquela bactéria na *baseline* e no final a sua deteção foi reduzida.

No que concerne à *Pg* verificou-se um aumento da mesma ao longo do período experimental, tendo a sua maior concentração sido detetada na S17. Estes resultados corroboram os de Tillmanns et al.²¹¹, Nociti et al.²³⁸ e Shibli et al.²⁴¹ na medida em que também aqueles investigadores detetaram esta bactéria no final dos respetivos protocolos experimentais. Porém, não corroboram os de Hayek et al.²⁵³, como já referido anteriormente.

No presente protocolo experimental avaliou-se a espécie *Streptococcus* o que não permite uma comparação direta com nenhum dos estudos acima mencionados, na medida em que aqueles avaliaram especificamente o *Streptococcus beta-hemolítico*. No entanto, Shibli et al.²⁴¹ e Hayek et al.²⁵³ reportaram a presença do *Streptococcus beta-hemolítico* no final do procedimento experimental, sendo que um destes grupos relatou um aumento estatisticamente significativo desde a *baseline* até ao final do protocolo. Estes resultados estão parcial-

mente de acordo com os obtidos neste estudo na medida em que todos assinalam a presença daquela bactéria (ou espécie) no fim do protocolo.

As diferenças microbiológicas encontradas entre os resultados dos vários grupos de investigação e os presentes podem estar relacionadas com vários aspetos, como o material a partir do qual são feitas as ligaduras, a dieta fornecida aos animais e os diferentes métodos de análise microbiológica, tendo estes já sido discutidos anteriormente.

O material que constitui a ligadura pode ter influência nos diferentes resultados microbiológicos^{241 238}. Otten *et al.*³⁸¹ realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* onde testaram a colonização por determinados tipos de bactérias, de diferentes tipos de fio de sutura utilizados em cirurgia oral. Verificaram que o crescimento da *P. intermedia* é influenciado pelo tipo de fio utilizado.

Nos modelos experimentais com recurso a ligaduras estas são deixadas por um determinado período de tempo no sulco peri-implantar, o que levará a um processo de reação da mesma com os fluidos biológicos presentes no local. A grande maioria dos estudos utiliza ligaduras de seda, de algodão ou elásticos de borracha como ligaduras peri-implantares¹⁷⁹. Durante o processo de degradação, o tipo de fio utilizado irá determinar o tipo de reação inflamatória, podendo estimular a invasão bacteriana ao longo do próprio fio³⁸². Devido às propriedades do material utilizado vários graus de colonização e formação de biofilme sobre a superfície do fio irão ocorrer em apenas poucas horas³⁸³. Esta colonização difere de material para material, sendo a seda mais propícia à colonização bacteriana do que outros³⁸⁴. Também a configuração do fio, monofilamento ou entrelaçado, influencia o crescimento bacteriano sobre o mesmo. O fio de sutura monofilamento demonstrou menor crescimento bacteriano que a sutura entrelaçada^{384 308}.

Assim, de acordo com o exposto, verifica-se que o material com que a ligadura é fabricada influencia a microbiologia presente sobre a mesma. Os atuais modelos canídeos de indução de defeitos peri-implantares utilizam vários materiais¹⁷⁹ que desta forma contribuem de forma distinta para o tipo de bactéria presente no local onde a ligadura se encontra, isto é o sulco peri-implantar. Assim, o tipo de bactéria presente no sulco peri-implantar irá depender do material a partir do qual a ligadura é produzida. Deste modo introduz-se um fator que contribuirá não só para a heterogeneidade dos resultados microbiológicos como também para o enviesamento dos mesmos face ao que se encontra na clínica.

Recentemente tem sido levantada a questão do contributo da microbiologia na etiologia da peri-implantite.

Nalgumas situações foi descrita a semelhança entre o aparecimento de problemas clínicos em torno de dentes e de implantes dentários. A inflamação gengival (gingivite) em torno dos dentes foi comparada com a mucosite peri-implantar, tendo sido definida como uma versão da gingivite observada em torno de implantes³⁸⁵. Para além disso a periodontite associada aos dentes foi comparada com a destruição de tecido peri-implantar. No que concerne à dentição natural há evidência convincente que indica que a rutura do equilíbrio da homeostase do hospedeiro, de origem polimicrobiana, irá iniciar uma inflamação tecidular em indivíduos suscetíveis^{386 387 141 388}. Tal como nos dentes, também os implantes dentários podem apresentar bolsas peri-implantares, constituindo um ambiente anaeróbico e acumulando bactérias semelhantes às presentes nas bolsas periodontais^{7 389 310}. No entanto, isto não indica que a infeção seja necessariamente a causa inicial da rutura dos tecidos peri-implantares. O contributo da infeção, ou da sobrecarga oclusal, para o desenvolvimento da perda óssea progressiva em torno de implantes osteointegrados permanece controversa^{264,390}. Assim, a perda óssea peri-implantar associada a sobrecarga oclusal é muitas vezes seguida por uma perda de inserção e subsequente aumento da bolsa peri-implantar. Esta bolsa anaeróbica recém-formada irá servir para armazenar uma microflora perio-patogénica e esta microflora subgengival irá refletir a colonização, desenvolvimento e maturação de um biofilme num ambiente favorável. Este facto pode contribuir para uma perda óssea peri-implantar adicional^{6 264}. Assim ainda está por demonstrar o que inicia a perda óssea marginal em torno dos implantes osteointegrados,

sendo este um campo de controvérsia académica. Por um lado, a teoria da infeção inicial microbiana e por outro a infeção é considerada secundária à rutura inicial da osteointegração, resultante de fatores não microbianos.

De acordo com recentes publicações não há evidência que a perda óssea progressiva seja geralmente iniciada por algum tipo de processo infeccioso. Havendo a presença de uma infeção purulenta podem estar presentes microrganismos, no entanto isto não indica que os mesmos tenham sido necessariamente a causa de reabsorção óssea marginal^{1,272}. Também autores como Becker *et al.*³⁹¹ e Chvartzaid & Koka³⁸⁵ não encontram evidência convincente que aponte para uma(s) bactéria(s) específica para iniciar o processo de reabsorção de osso marginal peri-implantar.

A interface entre o implante e a mucosa apresenta um componente epitelial e um componente de tecido conjuntivo. O componente epitelial, apelidado barreira epitelial, tem cerca de 2 mm enquanto que o tecido conjuntivo tem cerca de 1,5mm^{392, 115, 340, 393, 394}.

Nos IC, o programa de controlo da higiene oral permitiu observar, por norma, pilares de cicatrização livres de placa bacteriana. Esta observação está de acordo com os resultados de Berglundh *et al.*¹¹⁵ e atesta o adequado programa estabelecido para controlo da higiene oral.

Da mesma forma, na maioria dos cortes histológicos, não é visível a presença de PB no sulco peri-implantar. Na ausência de inflamação este sulco apresenta uma quantidade mínima de fluido crevicular e leucócitos¹⁸¹. Entre as células que constituem quer o epitélio sulcular (ES) quer o epitélio juncional (EJ) é possível observar a presença reduzida de células de natureza inflamatória, sendo bastante menor no EJ. Esta presença corresponde a uma normal dinâmica fisiológica presente num local que estabelece uma interface entre o meio interno e o meio externo²⁷⁷. As células que constituem o EJ permitem a passagem do fluido crevicular gengival e de células inflamatórias para o sulco gengival. Da mesma forma, apresenta um rápido *turnover* que auxilia na manutenção de um favorável equilíbrio hospedeiro-parasita bem com rápida reparação dos tecidos lesados³⁹⁵, sendo substituído a cada 4-6 dias enquanto o epitélio sulcular demora mais dias^{395, 396}. O epitélio juncional apresenta no seu interior fenestrações que permitem a troca de substâncias. O fluido crevicular gengival move-se através destas fenestrações para os espaços intercelulares e posteriormente para o sulco gengival. Da mesma forma leucócitos movem-se nos espaços intercelulares deste epitélio para o sulco, de forma organizada³⁹⁷.

A observação realizada no presente estudo relativa à presença de células de natureza inflamatória no seio do epitélio sulcular e juncional não corrobora os resultados previamente obtidos por Berglundh *et al.*¹¹⁵ pois estes autores, também utilizando um controlo diário de placa bacteriana, descreveram uma mucosa peri-implantar livre de infiltrado inflamatório celular.

De referir ainda que, apesar de no presente estudo não se ter realizado uma quantificação dessa estrutura, na avaliação qualitativa do grupo IC, foi descrita a menor quantidade e calibre de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo peri-implantar. Esta observação vem corroborar resultados de outros autores³⁹³. Esta observação, relativa aos IC, pode justificar a ausência de HS na avaliação clínica deste grupo de implantes na S17. O número reduzido e calibre diminuto dos vasos sanguíneos permitem-nos compreender a reduzida presença de células com perfil inflamatório quer no epitélio sulcular quer no epitélio juncional.

A observação de fibras de colagénio paralelas à superfície do implante vem corroborar os resultados de outros estudos animais^{115, 216, 338, 398} e humanos^{116, 399-401}. A fração de volume ocupada por estas fibras de colagénio na mucosa peri-implantar, de acordo com Berglundh *et al.*¹¹⁵, aumenta desde o dia 4 até à 4ª semana, não sofrendo alterações posteriores até às 12 semanas. Contudo, esta orientação paralela não é consensual uma vez que, outros investigadores¹¹⁷, indicam que estas fibras se unem ao colo do implante. De facto, e apesar do

no presente estudo a grande maioria das fibras de colagénio observadas se apresentarem paralelas à superfície do implante, também se detetaram algumas com uma direção mais oblíqua, a unirem-se ao corpo do implante na sua localização mais próxima do contacto com a crista óssea. Apesar de na literatura haver alguns artigos com referência às características histológicas dos tecidos adjacentes a implantes com a mesma superfície dos utilizados no presente estudo experimental^{215, 217, 219, 223, 224, 247, 255, 256, 402}, não foi encontrada qualquer referência à orientação, e possível integração, das fibras de colagénio na superfície do implante. No entanto, estudos animais utilizando outros modelos e superfícies de implantes referem uma orientação paralela³³⁸ ou predominantemente paralela¹¹⁵ destas fibras de colagénio em relação à superfície do implante, tendo esta orientação sido igualmente constatada em estudos humanos³⁹². De facto, sobre este tema não há consenso entre investigadores havendo resultados animais⁴⁰³ e clínicos⁴⁰⁴ que descrevem a inserção de fibras de colagénio na superfície do colar do implante. Uma possível explicação para esta diferença entre alguns estudos poderá ser o diferente tipo de implantes utilizado bem como distintos métodos de análise da imagem histológica. Nevins *et al.*⁴⁰⁴ utilizaram, para além da microscopia ótica, a microscopia de luz polarizada e microscopia eletrónica de varrimento. No presente estudo experimental a observação da aparente inserção de fibras de colagénio no colar do implante verificou-se numa zona muito próximo da crista óssea. Poderá ter havido o contributo das células osteoblásticas, presentes no tecido ósseo marginal adjacente, para produzir uma fina camada de tecido ósseo em contacto com a superfície do implante, onde posteriormente as fibras de colagénio se inseriram. No entanto, seria necessário outro tipo de análise microscópica para confirmar esta possibilidade.

O tecido ósseo que estabelece o contacto mais coronal com a superfície do implante apresenta características de vitalidade atestando um adequado processo de remodelação óssea, com predomínio de tecido ósseo lamelar. A presença de *cutting/filling cones* preenchidos por novo osso traduz a vitalidade da remodelação óssea, confirmada pela presença de novo tecido ósseo no interior desses cones.

Nos IT foi bastante notória a presença de placa bacteriana não só nos pilares de cicatrização bem como no epitélio da gengiva livre, resultantes da ausência de medidas de controlo da placa bacteriana. O consequente infiltrado inflamatório celular foi responsável pela destruição da integridade estrutural do epitélio da gengiva livre, epitélio sulcular bem como do córion, resultando na ulceração daqueles epitélios. Esta solução de continuidade acarreta a perda da eficácia funcional destes epitélios, permitindo uma comunicação entre o meio interno e meio externo, mais concretamente entre o infiltrado inflamatório presente na mucosa peri-implantar e aquele presente no sulco peri-implantar adjacente. Esta ulceração epitelial é também observada em modelos experimentais para estudo da peri-implantite, que fazem recurso da ligadura e posterior progressão espontânea sem a mesma^{255, 257}.

A presença de infiltrado inflamatório no presente estudo é corroborada pelo aumento do número e calibre dos vasos sanguíneos presentes no córion. De facto, apesar de não se ter realizado a sua quantificação, aquando da observação das imagens histológicas é notória a sua presença. A presença de um tecido conjuntivo adjacente ao epitélio sulcular com um considerável infiltrado inflamatório observado no presente estudo está de acordo com a descrição de lesões peri-implantares feitas em estudos animais sem recurso a ligadura³³⁰ ou com recurso a ligadura²⁵⁵, bem como em estudos em humanos⁴⁰⁵.

No epitélio juncional, quando comparado com a observação histológica realizada aos IC, verifica-se a presença de maior quantidade de infiltrado inflamatório celular, algumas vezes associado à destruição da sua integridade. No entanto, a desorganização estrutural provocada neste epitélio aparenta ser inferior à verificada no epitélio da gengiva livre bem como no epitélio sulcular. Esta diferença estará relacionada com a maior intensidade da resposta inflamatória presente nestes epitélios.

Por sua vez, o tecido conjuntivo compreendido entre a porção apical do epitélio juncional e o tecido ósseo apresenta um frequente infiltrado inflamatório celular, em contacto com a superfície do implante.

A presença de infiltrado inflamatório nesta área peri-implantar foi igualmente descrita por outros autores^{255, 257}, apesar de, no presente estudo, ela não ter sido quantificada e como tal não passível de comparação direta. Tal como observado nos IC, também aqui são visíveis fibras de colagénio numa disposição maioritariamente paralela à superfície do implante. Estas fibras de colagénio constituem a maioria das estruturas presentes neste local, havendo poucos fibroblastos bem como estruturas vasculares^{115, 324}. A mucosa peri-implantar, comparativamente à mucosa dentária, apresenta mais colagénio e menos fibroblastos, num *ratio* colagénio/fibroblastos de 109 comparado com um *ratio* de 4 (mucosa peri-implantar vs. mucosa dentária, respetivamente). Quer a gengiva dentária quer a mucosa peri-implantar apresentam uma semelhante distribuição de colagénio tipo I, III, IV, VII bem como fibronectina. Porém o colagénio tipo V é encontrado em maior quantidade nos tecidos peri-implantares. De todos, o colagénio tipo I é o principal constituinte do tecido conjuntivo supracristal da mucosa peri-implantar humana⁴⁰⁶.

O tecido ósseo marginal peri-implantar, em contacto com aquele tecido conjuntivo, mostra uma nítida presença de processos de reabsorção sem formação óssea associada, o que o distingue do tecido ósseo marginal dos IC. As áreas de reabsorção osteoclástica presentes neste tecido denotam uma maturação mais tardia e poderão estar associadas à aparente maior presença de infiltrado inflamatório celular presente naquela área. No entanto, ao contrário do descrito por outros autores que utilizaram modelos experimentais para estudar a peri-implantite^{255, 257}, no presente estudo não se verificou a presença de defeitos ósseos extensos, em forma de cratera. Apesar desses autores²⁵⁵ terem utilizado implantes com geometria e superfície igual aos utilizados no presente estudo, a utilização traumática de uma ligadura peri-implantar poderá ter estado na origem da destruição óssea associada à presença de um elevado número de osteoclastos, o que não foi observado no presente estudo.

No que concerne a técnica de coloração, o presente estudo utilizou uma metodologia mais vocacionada para a identificação de tecido duro com distintas fases de maturação. No entanto, o Azul de Toluidina permite ao investigador avaliar componentes celulares, apesar de não ser a técnica de coloração mais indicada especificamente para a identificação de células. Para tal a coloração de Giemsa ou a coloração de Ladewig poderia ser a opção alternativa. Ao utilizar a presente técnica de coloração obteve-se um equilíbrio entre a identificação de tecido ósseo bem como dos vários constituintes do tecido mole.

No presente estudo, para cada implante, obtiveram-se três cortes histológicos (vestibular, lingual e mesio-distal). Desta forma conseguiu-se obter uma imagem correspondente às distintas faces do implante, sempre utilizando a mesma coloração. Uma possibilidade que se considerou foi a realização de uma distinta técnica de coloração em algumas lâminas. No entanto, tendo em conta a diferente afinidade tintorial de outros corantes para as mesmas estruturas histológicas, aquando das medições histológicas das distintas faces, as mesmas estruturas não estariam igualmente coradas o que poderia levar a erros de interpretação e mensuração.

No presente estudo experimental, o infiltrado inflamatório celular foi avaliado percentualmente, definindo numa zona semelhante em todas as faces vestibulares dos implantes, uma *Region Of Interest*, sempre com a mesma área. Posteriormente, foi calculado o valor percentual de infiltrado nessa área. Alguns investigadores^{252, 255} calcularam a área ocupada pelo infiltrado inflamatório circunscrevendo a lesão com um cursor e calculando a área total. Apesar da presente metodologia apenas permitir um cálculo percentual, este é detalhado pois a distinta coloração da população celular inflamatória permite a identificação célula-a-célula. A metodologia anteriormente referida apresenta uma sobrevalorização do resultado pois toda a área circunscrita é tida em linha de conta, e com certeza haverá zonas nessa área sem um componente celular inflamatório.

No desenvolvimento de modelos experimentais com vista ao estudo de múltiplas situações relacionadas com a peri-implantite, foram vários os autores que realizaram uma análise histomorfométrica dos defeitos peri-implantares. Estes autores utilizaram como referência para as suas mensurações lineares, estruturas como a margem gengival, a zona apical do epitélio sulcular, a zona apical do epitélio juncional, a crista óssea em contacto

com o implante, o ombro do implante, o topo do pilar de cicatrização, a zona coronal e apical do infiltrado inflamatório e ainda a área ou percentagem de infiltrado inflamatório^{126, 186, 212, 240, 252, 224, 255, 258}.

No presente estudo, as mensurações foram realizadas nas quatro faces de cada implante. No entanto, outros autores^{224, 252, 126} realizam mensurações semelhantes apenas nas faces mesial e distal do implante, o que não permite uma percepção tão próxima da realidade de toda a lesão peri-implantar quanto a fornecida pela mensuração nas quatro faces. Nesta medida, o atual estudo apresenta-se como mais representativo da área peri-implantar, refletindo a sua plenitude.

Nos resultados de histomorfometria do presente modelo experimental, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os implantes controlo e os implantes teste no que respeita às seguintes medições: MG-aEJ(mm), MG-aES(mm), CO-aES(mm), CO-aEJ(mm), CO-MG(mm), OI-MG (mm), OI-CO(mm) e MG-aINF. Porém, relativamente à %INF verificou-se haver diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos.

Analisando os valores obtidos para os diferentes parâmetros avaliados nos implantes controlo (IC) verificou-se que existe uma adequada relação quantitativa entre eles. Assim, o valor obtido para a distância CO-MG ($3,45 \pm 0,42$ mm) encontra-se próximo do valor resultante do somatório de dois parâmetros que correspondem àquele, nomeadamente MG-aEJ com CO-aEJ ($2,35 \pm 0,52$ mm e $2,32 \pm 0,60$ mm), MG-aES com CO-aES ($1,64 \pm 0,58$ mm e $1,80 \pm 0,57$ mm) e OI-MG com OI-CO ($0,68 \pm 0,46$ mm e $2,87 \pm 0,43$ mm). A existência de uma relação de proximidade entre estes valores atesta a correta mensuração das distâncias referidas.

A distância MG-aEJ presente nos IC aproxima-se do valor clínico correspondente à PS ($2,35 \pm 0,52$ mm e $1,83 \pm 0,17$ mm, respetivamente). Através de estudos experimentais animais sabe-se que, utilizando uma pressão de 0,2-0,3N e numa situação de saúde peri-implantar, a ponta da sonda periodontal identifica a extensão apical do epitélio juncional. No entanto, em implantes com patologia peri-implantar a ponta da sonda penetra no tecido conjuntivo ficando mais próximo da crista óssea alveolar¹²⁶. Sabe-se também que tecidos peri-implantares saudáveis promovem um selamento peri-implantar que impede a progressão da sonda periodontal para além daquele limite^{126 131}. Tudo isto reflete um aumento na penetração da sonda periodontal à medida que o grau de inflamação nos tecidos peri-implantares aumenta. Adicionalmente, refere-se que a PS é um parâmetro medido clinicamente, utilizando uma sonda periodontal e aproximando o valor de sondagem ao 0,5mm mais próximo. Esta menor precisão de medição, comparada com a medição do parâmetro histológico utilizando um *software* de elevada precisão, acarreta possíveis erros derivados daquela aproximação.

Clinicamente, a sondagem peri-implantar pode ser influenciada por diversos fatores que podem ter um efeito sobre o ângulo de inserção da sonda. A diferença encontrada entre ambos os valores (MG-aEJ e PS) pode estar relacionada com dificuldades acrescidas na obtenção da PS devido ao desenho do implante, mais concretamente do seu colo polido angulado. De facto no 7th *European Workshop on Periodontology* (EWOP) foi mencionado que desenhos de implantes e/ou de pilares podem dificultar a sondagem, influenciando desta forma a profundidade de sondagem⁴.

Alguns estudos animais abordaram aspetos histomorfométricos dos tecidos peri-implantares utilizando implantes com superfície SLA. Porém, estes estudos induziram defeitos peri-implantares com recurso a ligadura^{255, 217, 215, 212} causando, desta forma, alterações estruturais que não são da exclusiva responsabilidade da placa bacteriana.

No entanto, parece importante destacar o estudo publicado em 2007, em que Berglundh *et al.*³³³ avaliaram a morfogénese da união da mucosa a dois tipos de implantes, não submersos, com igual geometria mas superfícies distintas (SLA® e maquinada). Estes implantes, colocados num modelo canídeo, foram sujeitos a um controlo diário da PB. Nesse estudo, a barreira epitelial formada em torno dos implantes atingiu a sua maturidade às 6 semanas de cicatrização e às 12 semanas atingiu a dimensão de 2,1mm. Apesar dos presentes resultados histomorfométricos se referirem a avaliações realizadas à 17^a semana verifica-se que o valor obtido para

a barreira epitelial (MG-aEJ: $2,32 \pm 0,60$ mm), foi semelhante à obtida por esses autores. A diferença nos distintos períodos de avaliação entre ambos estudos não teve qualquer influência sobre os tecidos peri-implantares pois, de acordo com os resultados de Berglundh *et al.*³³³, a maturação dos tecidos foi atingida antes das 12 semanas. Estes investigadores descrevem um tecido conjuntivo lateral à superfície do implante com poucas estruturas vasculares e fibras de colagénio, com uma orientação principalmente paralela à sua superfície. Por fim, no que concerne à distância MG-CO aqueles autores obtiveram um valor de 3,5 mm o qual corrobora os do presente estudo que foi de $3,39 \pm 0,62$ mm.

Utilizando implantes com uma superfície diferente da utilizada no presente protocolo experimental, Abrahamsson *et al.*³⁴⁰ avaliaram a resposta tecidular a implantes não-submersos e submersos. Diariamente, foi realizado o controlo da PB através de escovagem. Nove meses após colocação dos implantes, os animais foram sacrificados. A avaliação histomorfométrica da distância MG-aEJ foi de $1,97 \pm 0,52$ mm e $1,85 \pm 0,51$ mm para os grupos não-submerso e submerso, respetivamente, sem diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Apesar de se terem utilizado diferentes sistemas de implantes, os valores obtidos, no grupo não-submerso, para as distâncias MG-aEJ ($1,97 \pm 0,52$ mm), CO-MG ($3,15 \pm 0,34$ mm) e CO-aEJ ($1,18 \pm 0,31$ mm) são semelhantes aos obtidos no presente estudo experimental.

Também Berglundh *et al.*¹¹⁵, utilizando implantes diferentes dos usados no presente protocolo experimental, avaliaram a estrutura e composição dos tecidos moles saudáveis adjacentes a implantes e dentes. A histomorfometria da distância MG-aEJ e CO-MG foi $2,14 \pm 0,47$ mm e $3,80 \pm 0,65$ mm, respetivamente. Apesar da utilização de implantes e técnica para preparação das amostras diferentes da utilizada no presente protocolo, estes autores obtiveram valores semelhantes aos do presente estudo.

Da análise dos resultados histomorfométricos obtidos para os diferentes parâmetros analisados nos IT verificou-se que existe uma adequada relação quantitativa entre eles. O valor obtido para a distância CO-MG ($3,39 \pm 0,62$ mm) encontra-se próximo do valor obtido através do somatório de dois parâmetros que correspondem àquele, nomeadamente de MG-aEJ com CO-aEJ ($2,32 \pm 0,60$ mm e $1,09 \pm 0,62$ mm), de MG-aES com CO-aES ($1,79 \pm 0,68$ mm e $1,68 \pm 0,91$ mm) e de OI-MG com OI-CO ($0,55 \pm 0,66$ mm e $2,87 \pm 0,48$ mm). A existência de uma relação de proximidade entre estes valores, tal como aconteceu para os IC, atesta a correta mensuração das distâncias referidas.

A distância histológica MG-aEJ obtida para este grupo de implantes ($2,32 \pm 0,60$ mm) é ligeiramente inferior ao parâmetro clínico PS ($2,44 \pm 0,38$ mm). De acordo com os resultados do coeficiente de correlação existe, entre ambas as variáveis, uma correlação positiva, apesar de fraca, estatisticamente significativa (gráfico 35). Como já mencionado anteriormente, a penetração da sonda periodontal no sulco peri-implantar é dependente do estado de saúde daqueles tecidos^{126, 131}. Na análise qualitativa dos IT observou-se a presença de um epitélio sulcular e juncional ulcerados. Esta ulceração, sempre associada a um infiltrado inflamatório celular, foi mais visível no epitélio sulcular e em menor grau em algumas zonas mais coronais do epitélio juncional. Deste modo, o limite mais apical do epitélio juncional permaneceu íntegro facilitando a sua identificação e consequente mensuração. A inexistência de uma integridade epitelial favorece, aquando da sondagem peri-implantar, a progressão da sonda para apical do mesmo.

O epitélio sulcular não se apresenta aderido à superfície do implante, verificando-se esta característica quer nas situações de saúde quer de ausência de saúde dos tecidos moles peri-implantares. Como tal, o ES não irá funcionar como uma barreira e interferir com a progressão da sonda periodontal, pelo que não será de estranhar a inexistência de uma correlação estatisticamente significativa entre a PS e a distância MG-aES, quer para os IC quer para os IT (gráficos 36 e 37).

A presença de um infiltrado inflamatório nos tecidos peri-implantares está igualmente associada com a destruição das fibras de colagénio, a qual acarreta a desorganização estrutural do tecido conjuntivo⁴⁰⁷. Porém,

esta destruição não está presente na zona mais apical do tecido conjuntivo adjacente ao implante justificando-se assim a reduzida diferença medida entre a MG-aEJ e a PS.

Todas estas características histológicas mencionadas, como seja a presença de um infiltrado inflamatório celular com um aumento do número e calibre de vasos sanguíneos e conseqüente ulceração do ES e do EJ, podem estar na origem da explicação do elevado valor percentual obtido no parâmetro clínico HS no final do período experimental ($85,33 \pm 17,41$).

A maior percentagem de PPB no grupo IT, instalando-se na área peri-implantar desde a primeira observação realizada na S3, acarreta o desenvolvimento de um infiltrado inflamatório nos tecidos envolventes. No entanto, este infiltrado inflamatório celular, apesar de ser estatisticamente superior relativamente aos IC, não deixa de ser muito reduzido ($5,90 \pm 2,53\%$). Esta percentagem de INF não foi a suficiente para promover a destruição do colagénio presente no tecido conjuntivo adjacente à superfície do implante. Assim, as fibras de colagénio ali presentes, com a sua organização estrutural paralela em relação à superfície do implante, não sofreram praticamente qualquer alteração, principalmente na zona mais apical do tecido conjuntivo peri-implantar.

A inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre IC e IT para a distância MG-aEJ ($2,35 \pm 0,52\text{mm}$ e $2,32 \pm 0,60\text{mm}$, respetivamente) está em desacordo com a comparação inter-grupo dos resultados clínicos quer de HS quer de PS, na S17.

Relativamente à percentagem de HS verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os IC ($0,00 \pm 0,00$) e os IT ($85,33 \pm 17,41$), sendo que estes últimos apresentavam um valor elevado. No caso dos IC, a bolsa peri-implantar apresentava um EJ íntegro e uma quase ausência de INF. No entanto, para os IT, como já referido, um ES e um EJ ulcerados e uma maior quantidade de vasos sanguíneos observados no tecido conjuntivo estão na base do valor de HS obtido para os IT na S17.

No que concerne à PS, a presença de diferenças estatisticamente significativas entre IC e IT não está de acordo com a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre ambos grupos para a distância MG-aEJ. Em ambos os grupos, as duas referências histológicas que servem de base a esta medição encontram-se integras e de fácil identificação. No entanto, nos IT, a presença de ulceração no ES e no EJ permitirá a progressão da sonda periodontal através do mesmo podendo estender-se para além do ponto mais apical do EJ. Outro fator que pode auxiliar a compreender esta diferença entre PS e MG-aEJ é a qualidade da adesão das células que compõem o EJ. O espaço intercelular no EJ é, relativamente ao volume do tecido, comparativamente superior ao do EOG. Da mesma forma, o número de desmossomas é menor no EJ, comparativamente ao EOG⁴⁰⁸. O EJ permite a passagem do fluido crevicular gengival e de células inflamatórias para o sulco gengival. O seu rápido *turnover* auxilia na manutenção de um equilíbrio favorável hospedeiro-parasita bem como na rápida reparação dos tecidos lesados³⁹⁵, sendo substituído a cada 4-6 dias, enquanto o epitélio sulcular demora mais dias. Assim, a menor qualidade de adesão celular neste local, bem como a maior percentagem de INF presente no IT, pode ajudar a compreender a menor integridade estrutural desta zona e conseqüente maior penetração da sonda periodontal.

Na histomorfometria dos resultados histológicos verificou-se que, entre todos os parâmetros analisados, apenas a %INF diferia de forma estatisticamente significativa entre os implantes controlo e implantes teste. Esta percentagem foi avaliada a partir de uma área igual em todas as imagens histológicas analisadas, correspondente a uma zona lateral do EJ e adjacente ao ombro do implante. A escolha deste local para a determinação deste parâmetro relaciona-se com o facto de a zona de união pilar-implante ser propícia à maior acumulação de bactérias^{368,409,410,325} e como tal os tecidos adjacentes desencadearem uma resposta inflamatória mais exuberante. Outro facto que contribuiu para a escolha desta zona foi a análise prévia de todas as imagens histológicas, antes de iniciar a mensuração de qualquer parâmetro. Esta análise permitiu ter uma ideia inicial da zona onde aparentemente estava presente uma maior quantidade de infiltrado inflamatório celular. Outros autores realizaram a histomorfometria deste parâmetro na mesma zona, o que permite uma comparação de resultados³¹².

De acordo com o estudo de Ericsson *et al.* publicado em 1992³¹², o infiltrado inflamatório peri-implantar resultante da acumulação de PB durante 3 meses, apresenta uma extensão apical superior à identificada nos tecidos gengivais. Apresenta ainda um volume (em percentagem de volume ocupado pelos componentes na área de infiltrado inflamatório) composto essencialmente por colagénio ($19,8 \pm 2,4$), por vasos sanguíneos ($17,5 \pm 4,5$), por plasmócitos ($14,5 \pm 3,7$), por fibroblastos ($3,4 \pm 1,1$) e por tecido residual (matriz, nervos, células não identificadas e outros constituintes celulares) ($42,5 \pm 2,1$). No ano anterior, num estudo animal desenvolvido por Berglundh *et al.*¹¹⁵, verificou-se que os tecidos peri-implantares saudáveis eram constituídos principalmente por colagénio ($87,2 \pm 3,1\%$), apresentando também vasos sanguíneos ($6,4 \pm 1,9\%$), fibroblastos ($0,8 \pm 0,1\%$) e tecido residual ($4,8 \pm 1,5\%$). Da interpretação dos resultados de ambos os estudos, torna-se notório que o colagénio é o elemento fundamental e altamente prevalente num tecido conjuntivo peri-implantar saudável. Numa situação de inflamação devida à acumulação de PB durante 3 meses, foi possível verificar que a integridade celular e de componentes fundamentais para o tecido peri-implantar, como o colagénio, foi altamente afetada. As fibras de colagénio desempenham um papel fundamental no estabelecimento de uma barreira peri-implantar protetora eficaz. As suas fibras com uma orientação circular à volta do implante auxiliam na homeostasia do leito peri-implantar saudável.

Em 2004, Zitzmann *et al.*²⁵² desenvolveram um modelo experimental animal onde, durante um período de 2 meses, induziram peri-implantite com recurso a ligaduras e acumulação de placa bacteriana (período 1). De seguida estas foram removidas e a lesão foi deixada progredir durante mais 12 meses apenas com acumulação de PB (período 2 - progressão espontânea). Neste estudo foi quantificada a área de tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório celular ($2,64 \pm 1,05 \text{ mm}^2$), de PB ($0,69 \pm 0,77 \text{ mm}^2$) e de pus ($0,79 \pm 0,72 \text{ mm}^2$). No presente estudo experimental também se quantificou o infiltrado inflamatório, porém fez-se de uma forma percentual, não permitindo comparar resultados com os anteriormente mencionados. Relativamente aos resultados histomorfométricos daqueles autores, a mucosa peri-implantar (CO-MG) apresentava uma altura de $5,66 \pm 1,24 \text{ mm}$ e a barreira epitelial (MG-aEJ) uma altura de $1,35 \pm 0,58 \text{ mm}$. O tecido conjuntivo lateral ao implante (CO-aEJ) media $4,31 \pm 1,61 \text{ mm}$, a distância MG-aINF era de $4,47 \pm 1,60 \text{ mm}$ e a distância OI-CO foi de $5,66 \pm 0,73 \text{ mm}$. Comparando estes resultados com os do presente estudo, verifica-se que os primeiros são superiores, com exceção da altura da barreira epitelial. Nos primeiros 2 meses do seu modelo experimental, Zitzmann *et al.*²⁵² utilizaram ligaduras concomitantemente com PB. A ação traumática que as ligaduras exercem sobre os tecidos adjacentes provoca uma resposta inflamatória intensa, com um efeito sobre o tecido ósseo diferente daquele provocado apenas pela PB, tal como corroborado pelos resultados radiográficos. Na realidade, estes dados relativos à rápida perda óssea devido ao uso da ligadura corroboram os resultados anteriores de outros autores^{156 186,251}. A utilização da ligadura parece estar na base da diferença no resultado relativo à distância OI-CO entre ambos estudos ($5,6 \pm 0,73 \text{ mm}$ vs. $2,87 \pm 0,43 \text{ mm}$). Esta perda óssea associada à ligadura já tinha sido descrita por Marinelo *et al.*¹⁸⁶, tendo verificado que 1 mês após a sua remoção, a lesão inflamatória estendia-se desde a mucosa até à medula óssea. No entanto, 3 meses após a sua remoção esta lesão já estava encapsulada e separada do tecido ósseo por tecido conjuntivo denso. No estudo de Zitzmann *et al.*²⁵² há uma variabilidade na perda óssea após a remoção das ligaduras, tendo-se verificado no “período 2” a perda de 16 dos 21 implantes utilizados. Da mesma forma, 3 dos 5 cães apresentaram biópsias onde se observava uma mucosa com abundantes lesões inflamatórias que se estendiam para apical do epitélio da bolsa. Esta variabilidade foi descrita por outros autores¹⁸⁶, os quais referiram que 3 meses após remoção das ligaduras um dos cães perdeu 3 dos 4 implantes, estando os restantes estáveis. A razão para esta diferença na extensão da perda óssea peri-implantar, após a remoção das ligaduras, ainda hoje é objeto de discussão, no entanto, apontam-se como possíveis causas a diferença na localização dos implantes e consequente diferença na microflora subgengival ou a qualidade da resposta do hospedeiro à infeção²⁵².

Outra diferença histomorfométrica entre o estudo de Zitzmann *et al.*²⁵² e o presente estudo diz respeito ao maior comprimento da barreira epitelial, isto é à distância MG-aEJ, e menor altura do tecido conjuntivo peri-implantar obtidos neste estudo (CO-aEJ) (MG-aEJ: $1,35 \pm 0,58$ mm vs. $2,35 \pm 0,52$ mm; CO-aEJ: $4,31 \pm 1,61$ mm vs. $1,01 \pm 0,40$ mm). Uma possível explicação para estas diferenças poderá ser o diferente tempo de evolução do modelo, pois estes autores permitiram uma evolução da lesão peri-implantar durante 14 meses (2 meses com ligadura e placa bacteriana e outros 12 meses sem ligadura mas também com placa bacteriana) e o presente estudo apenas 17 semanas, bem como a diferente geometria dos implantes utilizados por aquele grupo. Relativamente à rugosidade do componente transmucoso, Abrahamsson *et al.*⁴¹¹ demonstraram, num estudo animal, que a adesão dos tecidos moles aos componentes transmucosos não era influenciada pela sua rugosidade. Finalmente, outra característica que poderá ter contribuído para a diferença nas distâncias avaliadas entre o presente estudo e o de Zitzmann *et al.*²⁵² relaciona-se com o facto de neste, devido à perda óssea provocada pela ligadura, o componente celular da barreira epitelial estabelecer uma interface com a superfície do implante que normalmente está unida ao osso. Sabe-se que a textura da superfície do implante influencia a composição do filme proteico bem como a orientação das moléculas que adsorvem à sua superfície, sendo isto crucial para a formação de uma interface com o tecido adjacente⁴¹².

Posteriormente, alguns autores^{224,255} desenvolveram estudos experimentais utilizando o modelo de Zitzmann *et al.*²⁵², com ligeiras alterações, e utilizando implantes com a superfície igual à do presente estudo.

Em 2007, Berglundh *et al.*²²⁴ estudaram a progressão de peri-implantite em implantes com duas superfícies diferentes: SLA e polida. A lesão peri-implantar foi induzida com recurso a ligadura e acumulação de PB durante 4 meses. Posteriormente, foi removida e a lesão progrediu mais 5 meses com acumulação de PB. Histologicamente, para os implantes com superfície SLA, os valores obtidos para a PM-B (“Peri-implant Mucosa-Bone”)($6,11 \pm 2,67$ mm), PM-aJE($3,63 \pm 2,35$ mm), aJE-B ($2,48 \pm 2,28$ mm) e I-B (“Implant-Bone”)($7,34 \pm 2,08$ mm) foram consideravelmente superiores aos correspondentes obtidos para os IT do presente estudo, respetivamente MG-CO ($3,39 \pm 0,62$ mm), MG-aEJ ($2,32 \pm 0,60$ mm), CO-aEJ ($1,09 \pm 0,62$ mm) e OI-MG ($2,87 \pm 0,43$ mm). O mesmo se verifica com o estudo de Albouy *et al.*²⁵⁵. A justificação para esta discrepância já foi amplamente discutida com a avaliação do estudo de Zitzmann *et al.*²⁵².

Na descrição dos resultados histológicos qualitativos dos dois últimos estudos^{224,255} anteriormente mencionados, foi referida a presença de um infiltrado inflamatório intenso, adjacente a PB e cálculos, e um epitélio da bolsa ulcerado. Albouy *et al.*²⁵⁵ também referiu a presença de um considerável número de osteoclastos. Estes resultados são parcialmente corroborados pelos presentes pois também se obteve, para o grupo com acumulação de PB (implantes teste), a presença de um epitélio ulcerado adjacente a PB e cálculos. No entanto, foi observada uma limitada presença de osteoclastos no tecido ósseo adjacente aos implantes. Esta diminuta presença de osteoclastos indica a ausência de uma reabsorção óssea ativa. Contudo, decorrente da observação histológica qualitativa, foi possível observar a presença de uma superfície óssea alveolar adjacente aos implantes teste festonada, com o aspeto de típicas lacunas de Howship. Esta característica histológica, como já mencionado na descrição histológica qualitativa, não se observou nos implantes controlo e pode indicar que terá havido um processo de reabsorção.

Em síntese, apesar da análise histológica qualitativa permitir observar uma considerável quantidade de INF no córion adjacente ao ES, com nítida destruição e invasão do ES e alguma do EJ, histomorfometricamente não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos. Também as lacunas de Howship e cones de reabsorção/aposição óssea, com nítido predomínio de reabsorção, presentes nos IT, não pareceram apresentar qualquer influência nas medições dos parâmetros.

5 – Perspetivas futuras

A execução do presente protocolo experimental pretendeu responder a algumas questões previamente colocadas. No entanto, como é comum em processos de investigação, ao longo do mesmo podem surgir não só algumas respostas, como também muitas dúvidas que despertam novos desafios e lançam novas questões na comunidade científica.

Assim, de modo a melhorar o presente modelo experimental considera-se que o mesmo pode ser otimizado logo numa fase inicial do seu desenvolvimento aproveitando a maior acumulação de placa bacteriana nos pré-molares e molares maxilares. Até à presente data não parece ter sido avaliada a acumulação natural de placa bacteriana em pilares sobre implantes colocados no maxilar superior.

No seguimento deste objetivo pode também ser vantajoso o desenvolvimento de pilares de cicatrização que potenciem a acumulação de placa bacteriana. Os pilares de cicatrização comercialmente disponíveis estão desenhados para providenciar o oposto, isto é, uma menor acumulação de placa bacteriana, o que se pretende numa situação clínica.

De modo avaliar todo o potencial deste modelo mais “natural” como verdadeiro indutor de peri-implantite pode também ser útil prolongar a duração do período experimental pós-operatório.

A avaliação dos parâmetros clínicos pode beneficiar da utilização de índices que deem uma perspetiva da evolução dos mesmos. Em algumas situações o recurso à tecnologia imagiológica, como seja a fotografia digital ou captação de imagens 3D devidamente calibradas e padronizadas, podem permitir uma maior precisão das mensurações e respetivos resultados.

Relativamente ao componente microbiológico destes modelos experimentais será vantajoso caracterizar a microbiologia antes da indução do modelo experimental. Assim será possível ter uma perceção longitudinal da sua evolução. Do mesmo modo devem ser recolhidas amostras microbiológicas nos sulcos gengivais de dentes adjacentes, contralaterais e antagonistas. Só assim se conseguirá obter uma perceção não só da dinâmica de colonização do sulco peri-implantar como da respetiva proveniência.

Capítulo IV. Conclusões



Dentro das limitações deste modelo experimental pode-se concluir que:

- A ausência de medidas de controlo de placa bacteriana induziu alterações significativas em alguns dos parâmetros clínicos peri-implantares, nomeadamente, um aumento da acumulação de placa bacteriana, de mucosite peri-implantar, da profundidade de sondagem, da hemorragia após sondagem e do nível de inserção clínico.
- A avaliação radiológica não detetou alterações estatisticamente significativas na perda óssea peri-implantar associadas à ausência de medidas de controlo da placa bacteriana.
- No final do período experimental, a ausência de medidas de controlo de placa bacteriana induziu alterações quantitativas e qualitativas ao nível da população bacteriana peri-implantar, nomeadamente um aumento significativo na quantidade de DNA detetada no sulco peri-implantar das bactérias totais, de *Fusobacterium spp.*, de *Porphyromonas gingivalis* e de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Do ponto de vista de avaliação histológica a ausência de medidas de controlo da placa bacteriana aumentou significativamente a percentagem de infiltrado inflamatório peri-implantar.
- Não se conseguiu estabelecer uma associação entre presença ou a ausência de medidas de controlo de placa bacteriana e a perda óssea peri-implantar ao longo do período experimental.
- A profundidade de sondagem correlacionou-se positivamente com a distância histológica da margem gengival à zona apical do epitélio juncional nos implantes não sujeitos a controlo da placa bacteriana.
- A distância radiográfica entre o ombro do implante e o contacto mais coronal implante-osso correlacionou-se positivamente com a distância histológica ombro do implante-crista óssea, independentemente das medidas de controlo da placa bacteriana.
- A revisão da literatura mostra claramente que o modelo experimental canídeo para estudo de peri-implantite apresenta metodologias de indução da patologia baseadas na utilização de ligaduras. No entanto, todo o modelo experimental é bastante heterogéneo, no que se refere à metodologia de aplicação das mesmas, no tempo da sua permanência no sulco peri-implantar e nas medidas para controlo da placa bacteriana. Da utilização de ligaduras resulta a formação de um defeito peri-implantar de origem traumática que não mimetiza a etiopatogenia da peri-implantite humana.
- O modelo experimental testado baseia-se na ausência de medidas de controlo de placa bacteriana, evitando a colocação de ligaduras. O presente modelo proporcionou alterações significativas nos tecidos peri-implantares ao nível dos parâmetros clínicos, microbiológicos e histológicos. De entre os parâmetros clínicos alterados no final do protocolo experimental, destacam-se o aumento da mucosite, da profundidade de sondagem e da hemorragia após sondagem. Por outro lado, não se verificaram diferenças na perda óssea radiográfica. A avaliação microbiológica identificou uma heterogeneidade na deteção de DNA bacteriano em todos os animais. Da caracterização histológica deste modelo destaca-se o aumento do infiltrado inflamatório nos tecidos peri-implantares dos implantes de teste.

Apesar de todas estas alterações, as lesões diagnosticadas neste modelo não se sobrepõem devidamente com as características presentes na peri-implantite humana.



Capítulo V. Resumen



De modo a tornar possível o estudo da peri-implantite desenvolveram-se alguns modelos experimentais, utilizando principalmente o cão como modelo animal.

No início do presente trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o modelo experimental canídeo para estudo da peri-implantite. Foram incluídos 56 artigos para análise. Todos os autores recorreram a ligaduras, contudo verificou-se uma grande heterogeneidade nas metodologias utilizadas. Este modelo experimental apresenta falhas na recriação do ambiente anatómico, fisiológico ou patológico, encontrado na peri-implantite humana, sendo necessário estudar novos modelos experimentais.

O objetivo principal deste estudo é determinar se a ausência de controlo de placa bacteriana altera os parâmetros clínicos, radiográficos, microbiológicos e histológicos nos tecidos peri-implantares de um modelo experimental canídeo.

Em seis cães da raça Beagle, com 2,5 anos de idade, foram extraídos bilateralmente os pré-molares e primeiros molares mandibulares (semana -24). Oito semanas após as extracções, suspenderam-se as medidas de controlo da placa bacteriana (semana -16), que se mantiveram até à colocação dos implantes (semana 0).

Em cada hemimandíbula, foram colocados dois implantes com superfície SLA® (Standard Plus® Ø3,3x8mm, narrow neck, Institut Straumann® AG, Basel, Switzerland) as quais foram aleatoriamente distribuídas por dois grupos: um onde se realizou o controlo da placa bacteriana (implantes controlo - IC); outro onde não se realizou esse controlo (implantes teste - IT).

Para além da avaliação radiográfica no dia da colocação, os implantes foram avaliados clínica, radiográfica e microbiologicamente nas semanas 3, 6, 9, 12, 15 e 17, e histologicamente após a eutanásia dos animais, à 17ª semana. Clinicamente, foi avaliada a presença de placa bacteriana (PPB), a mucosite peri-implantar (MPI), a profundidade de sondagem (PS), a hemorragia após sondagem (HS), o nível da margem gengival (NMG), o nível de inserção clínico (NIC) e a supuração. Radiograficamente foi avaliada a variação da distância entre o ombro do implante (ODI) e o contacto mais coronal osso-implante (cOI).

Recorrendo à técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, foi quantificado o DNA das bactérias totais (BT), *Streptococcus* species, *Fusobacterium* species, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Prevotella intermedia* (Pi).

Em cortes não descalcificados, realizou-se a análise histomorfométrica para mensuração das seguintes distâncias: margem gengival-zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ), margem gengival-zona apical do epitélio sulcular (MG-aES), crista óssea-zona apical do epitélio sulcular (CO-aES), crista óssea-zona apical do epitélio

juncional (CO-aEJ), margem gengival-crista óssea (MG-CO), ombro do implante-crista óssea (OI-CO), margem gengival-zona apical do infiltrado inflamatório (OI-aINF) e percentagem de infiltrado inflamatório (%INF).

Analisou-se igualmente a correlação entre as variáveis PS e MG-aEJ ou MG-aES, bem como entre a variável ODI-aOI e OI-cOI.

No final do protocolo experimental, os parâmetros clínicos, PPB, MPI, PS, HS e NIC apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos, com os IT a revelar valores mais elevados.

Relativamente ao parâmetro radiográfico, a diferença entre grupos não revelou ser estatisticamente significativa.

A análise microbiológica identificou haver diferenças inter-grupos para as B.T., *Fusobacterium spp.*, Pg e Aa, com os IT a obter o valor mais elevado.

A histomorfometria apresentou uma única diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos, com os IT a apresentarem maiores valores de %INF.

Encontrou-se uma correlação positiva entre a PS e a MG-aEJ nos implantes teste. A distância radiográfica ODI-cOI e a histológica OI-cOI correlacionam-se positivamente para ambos grupos.

A ausência de medidas de controlo da placa bacteriana provocou diferenças estatisticamente significativas, entre ambos os grupos, em parâmetros clínicos, microbiológicos e histológicos. No entanto, apesar das alterações, as lesões diagnosticadas neste modelo não apresentam características devidamente sobreponíveis às características presentes na peri-implantite humana.

Palavras chave: modelo experimental, cão, peri-implantite.

Capítulo VI. Abstract



In order to study peri-implantitis some experimental models were developed, mainly using the dog as animal model.

At the beginning of this study, a bibliographic review was performed regarding the experimental dog model for peri-implantitis studies. Fifty-six studies were included for analysis. All used ligatures in order to establish a peri-implant lesion, with great methodological heterogeneity. Considering that the present experimental model fails to recreate the anatomic, physiologic or pathological environment of the clinical conditions found in human peri-implantitis, there is a need to research new experimental models.

The main objective of this study is to evaluate whether the absence of plaque control alters the clinical, radiological, microbiological and histological peri-implant tissue parameters.

Six 2 ½ year-old male Beagle dogs had their bilateral mandible premolars and first molar extracted (week -24). Eight weeks later plaque control measures were suspended (week -16) until implant placement (week 0).

Two SLA® surface implants (Standard Plus® Ø3,3x8mm, *narrow neck*, Institut Straumann® AG, Basel, Switzerland) were placed at each hemimandible and were randomly assigned to one of each group: a group with plaque control (control implants – CI); a group without plaque control (test implants – TI).

On the day of implant placement a radiographic evaluation was performed. Implants were then evaluated clinically, radiographically and microbiologically at weeks 3, 6, 9, 12, 15 and 17, and histologically after euthanasia. Presence of plaque (PP), mucositis (Muc), probing depth (PD), bleeding on probing (BOP), gingival marginal level (GML), clinical attachment level (CAL) and suppuration were clinically evaluated. The distance between implant shoulder (IS) and first bone to implant contact (fBIC) was evaluated radiographically.

Microbiological samples were collected during the 17 week experimental procedure. Using real-time polymerase chain reaction, the DNA of total bacteria (TB) load, *Streptococcus* species, *Fusobacterium* species, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) and *Prevotella intermedia* (Pi) was quantified.

After euthanasia, implant and peri-implant tissues were histologically analyzed using a undecalcified technique, and histomorphometry performed to measure the following distances: gingival margin-apical junctional epithelium (GM-aJE); gingival margin-apical sulcular epithelium (GM-aSE); bone crest-apical sulcular epithelium (BC-aSE); bone crest-apical junctional epithelium (BC-aJE); gingival margin-bone crest (GM-BC); implant shoulder-bone crest (IS-BC); gingival margin-apical inflammatory infiltrate (GM-aINF) and inflammatory infiltrate percentage (%INF).

A possible correlation between PD and GM-aJE or GM-aSE, and also between IS-fBIC and IS-BC, was analyzed.

Regarding the results of the clinical parameters at the end of the protocol PP, Muc, PD, BOP and CAL had statistically significant differences between groups, with higher values of TI.

The radiographic parameter evaluated, at the end of the procedure, revealed no statistically significant difference between groups.

At the end of the experimental protocol microbiological analysis identified intergroup differences for TB, *Fusobacterium spp.*, *Pg* and *Aa*, with TI having the highest value.

Histomorphometry showed a single statistically significant difference between both groups, with TI having the higher values of %INF.

Finally, a positive correlation was found between PD and the GM-aJE for TI. On the other hand, the radiographic distance IS-fBIC and histologic IS-HI correlate positively to both groups.

The absence of measures to control plaque was the variable tested in this experimental study, and resulted in statistically significant differences between both groups in clinical, microbiological and histological parameters. However, despite all these changes, the lesions seen in this model did not overlap features due to the characteristics present in the human peri-implantitis.

Key-words: experimental model, dog, peri-implantitis.

Capítulo VII. Bibliografía



1. Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is Marginal Bone Loss around Oral Implants the Result of a Provoked Foreign Body Reaction? *Clin Implant Dent Relat Res* 2013;1-11.
2. Albrektsson T, Isidor, F. Consensus report of session IV. Paper presented at: Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology, Charter House at Ittingen, Thurgau, Switzerland, 1993; 1994: 365-369.
3. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35(Suppl 8): 282-5.
4. Lang NP, Berglundh T. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011;38 (Suppl 11):178-81.
5. Levignac J. Periimplantation osteolysis- periimplantosis - periimplantitis. *Rev Fr Odontostomatol* 1965;12(8):1251-60.
6. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2(4):145-51.
7. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000* 1998;17:63-76.
8. Bragger U, Aeschlimann S, Burgin W, Hammerle CH, Lang NP. Biological and technical complications and failures with fixed partial dentures (FPD) on implants and teeth after four to five years of function. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(1):26-34.
9. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in *Implant Dentistry* reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 2002;29 (Suppl 3):197-212; discussion 32-3.
10. Karoussis IK, Bragger U, Salvi GE, Burgin W, Lang NP. Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(1):8-17.
11. 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. *J Clin Periodontol* 2006;33(4):290-5.
12. Renvert S, Roos-Jansaker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(4):509-16.
13. Maximo MB, de Mendonca AC, Alves JF, Cortelli SC, Peruzzo DC, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: preliminary results. *J Oral Implantol* 2008;34(5):268-73.
14. Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 2008;35(Suppl 8):292-304.
15. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35 (Suppl 8):286-91.

16. Behneke A, Behneke N, d'Hoedt B. A 5-year longitudinal study of the clinical effectiveness of ITI solid-screw implants in the treatment of mandibular edentulism. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(6):799-810.
17. Ekelund JA, Lindquist LV, Carlsson GE, Jemt T. Implant treatment in the edentulous mandible: a prospective study on Branemark system implants over more than 20 years. *Int J Prosthodont* 2003;16(6):602-8.
18. Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol* 2006;33(12):929-35.
19. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansaker AM, Pena AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, et al. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(4):380-5.
20. Zetterqvist L, Feldman S, Rotter B, Vincenzi G, Wennstrom JL, Chierico A, et al. A prospective, multicenter, randomized-controlled 5-year study of hybrid and fully etched implants for the incidence of peri-implantitis. *J Periodontol* 2010;81(4):493-501.
21. Mombelli A, Moene R, Decaillet F. Surgical treatments of peri-implantitis. *Eur J Oral Implantol* 2012; Suppl 5:S61-70.
22. Pjetursson BE, Helbling C, Weber HP, Matulienė G, Salvi GE, Bragger U, et al. Peri-implantitis susceptibility as it relates to periodontal therapy and supportive care. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(7):888-94.
23. Froum SJ, Rosen PS. A proposed classification for peri-implantitis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2012;32(5):533-40.
24. Tomasi C, Derks J. Clinical research of peri-implant diseases--quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2012;39 (Suppl 12):207-23.
25. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol* 2010;81(2):231-8.
26. Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol* 2011;38(3):285-92.
27. Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(4):440-6.
28. Fransson C, Wennstrom J, Berglundh T. Clinical characteristics at implants with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(2):142-7.
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. *J Clin Periodontol* 2006;33(4):296-301.
30. Gatti C, Gatti F, Chiapasco M, Esposito M. Outcome of dental implants in partially edentulous patients with and without a history of periodontitis: a 5-year interim analysis of a cohort study. *Eur J Oral Implantol* 2008;1(1):45-51.
31. Rocuzzo M, De Angelis N, Bonino L, Aglietta M. Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part I: implant loss and radiographic bone loss. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(5):490-6.
32. Cury PR, Horewicz VV, Ferrari DS, Brito R, Jr., Sendyk WR, Duarte PM, et al. Evaluation of the effect of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on the risk of peri-implantitis: a case-control study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(6):1101-5.
33. Pesce P, Menini M, Tealdo T, Bevilacqua M, Pera F, Pera P. Peri-implantitis: a systematic review of recently published papers. *Int J Prosthodont* 2014;27(1):15-25.
34. Mombelli A, Cionca N. The Prevalence of Peri-implantitis: How big is the problem? *Forum implantologicum* 2013;9(1):12-19.
35. Wilson Jr, TG. The positive relationship between excess cement and peri-implant disease: a prospective clinical endoscopic study. *J Periodontol* 2009;80(9):1388-92.
36. Linkevicius T, Vindasiute E, Puisys A, Linkeviciene L, Maslova N, Puriene A. The influence of the cementation margin position on the amount of undetected cement. A prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(1):71-6.
37. Tarnow DP, Cho SC, Wallace SS. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *J Periodontol* 2000;71(4):546-9.

38. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981;10(6):387-416.
39. Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Cochran DL. Crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 2000;71(9):1412-24.
40. Hammerle CH, Bragger U, Burgin W, Lang NP. The effect of subcrestal placement of the polished surface of ITI implants on marginal soft and hard tissues. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(2):111-9.
41. Gallucci GO, Grutter L, Chuang SK, Belser UC. Dimensional changes of peri-implant soft tissue over 2 years with single-implant crowns in the anterior maxilla. *J Clin Periodontol* 2011;38(3):293-9.
42. Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellon E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. *J Clin Periodontol* 2012;39(5):490-4.
43. Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P. Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice-based cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(8):826-33.
44. Bornstein MM, Cionca N, Mombelli A. Systemic conditions and treatments as risks for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; Suppl 24:12-27.
45. Heitz-Mayfield LJ, Huynh-Ba G. History of treated periodontitis and smoking as risks for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; Suppl 24:39-68.
46. Karoussis IK, Kotsovilis S, Fourmoussis I. A comprehensive and critical review of dental implant prognosis in periodontally compromised partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(6):669-79.
47. Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007; Suppl 22:173-202.
48. Mombelli A, Cionca N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 (Suppl 2):97-103.
49. Ong CT, Ivanovski S, Needleman IG, Retzepi M, Moles DR, Tonetti MS, et al. Systematic review of implant outcomes in treated periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 2008;35(5):438-62.
50. Quirynen M, Abarca M, Van Assche N, Nevins M, van Steenberghe D. Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with a history of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2007;34(9):805-15.
51. Safii SH, Palmer RM, Wilson RF. Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2010;12(3):165-74.
52. Schou S, Holmstrup P, Worthington HV, Esposito M. Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 (Suppl 2):104-23.
53. Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(6):667-76.
54. Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, et al. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part I: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(3):161-72.
55. Cordioli G, Majzoub Z, Castagna S. Mandibular overdentures anchored to single implants: a five-year prospective study. *J Prosthet Dent* 1997;78(2):159-65.
56. Deporter D, Watson P, Pharoah M, Levy D, Todescan R. Five- to six-year results of a prospective clinical trial using the ENDOPORE dental implant and a mandibular overdenture. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(2):95-102.
57. Gotfredsen K, Holm B. Implant supported mandibular overdentures retained with ball or bar attachments: a randomized prospective 5-year study. *Int J Prosthodont* 2000;13:125-30.
58. Hemmings KW, Schmitt A, Zarb GA. Complications and maintenance requirements for fixed prostheses and overdentures in the edentulous mandible: a 5-year report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:191-96.

59. Makkonen TA, Holmberg S, Niemi L, Olsson C, Tammisalo T, Peltola J. A 5-year prospective clinical study of Astra Tech dental implants supporting fixed bridges or overdentures in the edentulous mandible. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(6):469-75.
60. Mericske-Stern R, Steinlin Schaffner T, Marti P, Geering AH. Peri-implant mucosal aspects of ITI implants supporting overdentures. A five-year longitudinal study. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(1):9-18.
61. Arvidson K, Bystedt H, Frykholm A, von Konow L, Lothigius E. Five-year prospective follow-up report of the Astra Tech Dental Implant System in the treatment of edentulous mandibles. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(4):225-34.
62. De Bruyn H, Collaert B, Linden U, Johansson C, Albrektsson T. Clinical outcome of Screw Vent implants. A 7-year prospective follow-up study. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(2):139-48.
63. Eliasson A, Palmqvist S, Svenson B, Sondell K. Five-year results with fixed complete-arch mandibular prostheses supported by 4 implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(4):505-10.
64. Hellem S, Karlsson U, Almfeldt I, Brunell G, Hamp SE, Astrand P. Nonsubmerged implants in the treatment of the edentulous lower jaw: a 5-year prospective longitudinal study of ITI hollow screws. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3(1):20-9.
65. Andersson B, Odman P, Lindvall AM, Branemark PI. Cemented single crowns on osseointegrated implants after 5 years: results from a prospective study on CeraOne. *Int J Prosthodont* 1998a;11(3):212-8.
66. Andersson B, Odman P, Lindvall AM, Branemark PI. Five-year prospective study of prosthodontic and surgical single-tooth implant treatment in general practices and at a specialist clinic. *Int J Prosthodont* 1998b;11:351-55.
67. De Leonardis D, Garg AK, Pecora GE. Osseointegration of rough acid-etched titanium implants: 5-year follow-up of 100 minimatic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(3):384-91.
68. Fartash B, Arvidson K. Long-term evaluation of single crystal sapphire implants as abutments in fixed prosthodontics. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:58-67.
69. Henry PJ, Laney WR, Jemt T, Harris D, Krogh PH, Polizzi G, et al. Osseointegrated implants for single-tooth replacement: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11(4):450-5.
70. Mericske-Stern R, Grutter L, Rosch R, Mericske E. Clinical evaluation and prosthetic complications of single tooth replacements by non-submerged implants. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:309-18.
71. Palmer RM, Palmer PJ, Smith BJ. A 5-year prospective study of Astra single tooth implants. *Clin Oral Implants Res* 2000;11(2):179-82.
72. Scheller H, Urgell JP, Kultje C, Klineberg I, Goldberg PV, Stevenson-Moore P, et al. A 5-year multicenter study on implant-supported single crown restorations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(2):212-8.
73. Behneke A, Behneke N, d'Hoedt B. The longitudinal clinical effectiveness of ITI solid-screw implants in partially edentulous patients: a 5-year follow-up report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15(5):633-45.
74. Koth DL, McKinney RV, Steflik DE, Davis QB. Clinical and statistical analyses of human clinical trials with the single crystal aluminum oxide endosteal dental implant: five-year results. *J Prosthet Dent* 1988;60(2):226-34.
75. Weber HP, Crohin CC, Fiorellini JP. A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2000;11(2):144-53.
76. Jemt T, Bergendal B, Arvidson K, Bergendal T, Karlsson LD, Linden B, Rundcrantz T, Wendelhag I. Implant-supported welded titanium frameworks in the edentulous maxilla: a 5-year prospective multicenter study. *Int J Prosthodont* 2003;16:415-21.
77. Gotfredsen K, Karlsson U. A Prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and TiO₂-blasted surface. *Journal of Prosthodontics* 2001;10:2-7.
78. Ortorp A, Jemt T. Clinical experiences of implant-supported prostheses with laser-welded titanium frameworks in the partially edentulous jaw: a 5-year follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* 1999;1:84-91.
79. Wennerberg A, Jemt T. Complications in partially edentulous implant patients: a 5-year retrospective follow-up study of 133 patients supplied with unilateral maxillary prostheses. *Clin Implant Dent Relat Res* 1999;1:49-56.

80. Wyatt CCL, Zarb GA. Treatment outcomes of patients with implant-supported fixed partial prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:204-11.
81. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Linden U, Bergstrom C, van Steenberghe D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:639-45.
82. Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; Suppl 19:150-4.
83. Ortorp A, Jemt T. Laser-welded titanium frameworks supported by implants in the partially edentulous mandible: a 10-year comparative follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10:128-39.
84. Lekholm U, Grondahl K, Jemt T. Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006;8(4):178-86.
85. Ormianer Z, Palti A. Long-term clinical evaluation of tapered multi-threaded implants: results and influences of potential risk factors. *J Oral Implantol* 2006;32(6):300-7.
86. Romeo E, Ghisolfi M, Rozza R, Chiapasco M, Lops D. Short (8-mm) dental implants in the rehabilitation of partial and complete edentulism: a 3- to 14-year longitudinal study. *Int J Prosthodont* 2006;19(6):586-92.
87. Bragger U, Karoussis I, Persson R, Pjetursson B, Salvi G, Lang N. Technical and biological complications/failures with single crowns and fixed partial dentures on implants: a 10-year prospective cohort study. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(3):326-34.
88. Degidi M, Piattelli A. 7-year follow-up of 93 immediately loaded titanium dental implants. *J Oral Implantol* 2005;31(1):25-31.
89. Becker CM. Cantilever fixed prostheses utilizing dental implants: a 10-year retrospective analysis. *Quintessence Int* 2004;35(6):437-41.
90. Wennstrom JL, Ekestubbe A, Grondahl K, Karlsson S, Lindhe J. Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. a 5-year prospective study. *J Clin Periodontol* 2004;31:713-24.
91. Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(2):119-30.
92. Bornstein MM, Schmid B, Belser UC, Lussi A, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface. 5-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(6):631-8.
93. Elkhoury JS, McGlumphy EA, Tatakis DN, Beck FM. Clinical parameters associated with success and failure of single-tooth titanium plasma-sprayed cylindrical implants under stricter criteria: a 5-year retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:687-94.
94. De Boever AL, De Boever JA. Guided bone regeneration around non-submerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(5):549-56.
95. Wennstrom JL, Ekestubbe A, Grondahl K, Karlsson S, Lindhe J. Implant-supported single-tooth restorations: a 5-year prospective study. *J Clin Periodontol* 2005;32(6):567-74.
96. Jemt T, Lekholm U. Single implants and buccal bone grafts in the anterior maxilla: measurements of buccal crestal contours in a 6-year prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7(3):127-35.
97. Bernard JP, Schatz JP, Christou P, Belser U, Kiliaridis S. Long-term vertical changes of the anterior maxillary teeth adjacent to single implants in young and mature adults. A retrospective study. *J Clin Periodontol* 2004;31(11):1024-8.
98. Andersen E, Haanaes HR, Knutsen BM. Immediate loading of single-tooth ITI implants in the anterior maxilla: a prospective 5-year pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:281-87.
99. Buser D, Dula K, Lang NP, Nyman S. Long-term stability of osseointegrated implants in bone regenerated with the membrane technique. 5-year results of a prospective study with 12 implants. *Clin Oral Implants Res* 1996;7:175-83.
100. de Waal YC, van Winkelhoff AJ, Meijer HJ, Raghoobar GM, Winkel EG. Differences in peri-implant conditions between fully and partially edentulous subjects: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2013;40(3):266-86.

101. Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2013;84(11):1586-98.
102. Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Hammerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):329-39.
103. Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(7):772-7.
104. Kaemmerer PW LK, Karbach J, Wegener J, Al-Nawas B, Wagner W. Prevalence of peri-implant diseases associated with a rough-surface dental implant system: 9 years after insertion *Int J Oral Imp Clin Res* 2011; 2:135-39.
105. Cho-Yan Lee J, Mattheos N, Nixon KC, Ivanovski S. Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(3):325-33.
106. Mombelli A, Muller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2012;23 (Suppl 6):67-76.
107. Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brex MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(8):934-40.
108. Salvi GE, Lang NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; Suppl 19:116-27.
109. Schou S, Holmstrup P, Hjorting-Hansen E, Lang NP. Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 1992;3(4):149-61.
110. 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.
111. Lang NP, Bragger U. Periodontal diagnosis in the 1990s. *J Clin Periodontol* 1991;18(6):370-9.
112. Listgarten MA, Buser D, Steinemann SG, Donath K, Lang NP, Weber HP. Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva. *J Dent Res* 1992;71(2):364-71.
113. James RA, Schultz RL. Hemidesmosomes and the adhesion of junctional epithelial cells to metal implants--a preliminary report. *Oral Implantol* 1974;4(3):294-302.
114. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M, Bertolai R, Panzoni E. Histologic aspects of the bone and soft tissues surrounding three titanium non-submerged plasma-sprayed implants retrieved at autopsy: a case report. *J Periodontol* 1997;68(7):694-700.
115. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(2):81-90.
116. Chavrier C, Couble ML, Hartmann DJ. Qualitative study of collagenous and noncollagenous glycoproteins of the human healthy keratinized mucosa surrounding implants. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(3):117-24.
117. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981;9(1):15-25.
118. Fartash B, Arvidson K, Ericsson I. Histology of tissues surrounding single crystal sapphire endosseous dental implants: an experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 1990;1(1):13-21.
119. Arvidson K, Fartash B, Hilliges M, Kondell PA. Histological characteristics of peri-implant mucosa around Branemark and single-crystal sapphire implants. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(1):1-10.
120. Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Fiehn NE, Skovgaard LT. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. A histologic comparison in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res* 2002;13(2):113-26.
121. Ericsson I, Lindhe J. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 1993;20(9):623-7.
122. Christensen MM, Joss A, Lang NP. Reproducibility of automated periodontal probing around teeth and osseointegrated oral implants. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(6):455-64.

123. Cox JF, Zarb GA. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2(2):91-100.
124. Mombelli A, Mericske-Stern R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res* 1990;1(1):1-7.
125. Apse P, Zarb GA, Schmitt A, Lewis DW. The longitudinal effectiveness of osseointegrated dental implants. The Toronto Study: peri-implant mucosal response. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1991;11(2):94-111.
126. Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissues. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(4):191-201.
127. Armitage GC, Svanberg GK, Loe H. Microscopic evaluation of clinical measurements of connective tissue attachment levels. *J Clin Periodontol* 1977;4(3):173-90.
128. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000* 1994;4:81-6.
129. Lang N. How Do We Detect Peri-implantitis? *Forum implantologicum* 2013;9(1):6-11.
130. Etter TH, Hakanson I, Lang NP, Trejo PM, Caffesse RG. Healing after standardized clinical probing of the perimplant soft tissue seal: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2002;13(6):571-80.
131. Abrahamsson I, Soldini C. Probe penetration in periodontal and peri-implant tissues. An experimental study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(6):601-5.
132. Mombelli A. Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Curr Opin Periodontol* 1997;4:127-36.
133. Gerber JA, Tan WC, Balmer TE, Salvi GE, Lang NP. Bleeding on probing and pocket probing depth in relation to probing pressure and mucosal health around oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(1):75-8.
134. Quirynen M, van Steenberghe D, Jacobs R, Schotte A, Darius P. The reliability of pocket probing around screw-type implants. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(4):186-92.
135. Serino G, Turri A, Lang NP. Probing at implants with peri-implantitis and its relation to clinical peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(1):91-5.
136. Lang NP, Nyman S, Senn C, Joss A. Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol* 1991;18(4):257-61.
137. Karayiannis A, Lang NP, Joss A, Nyman S. Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health in patients with a reduced but healthy periodontium. A clinical study. *J Clin Periodontol* 1992;19(7):471-5.
138. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. VII. Bleeding, suppuration and probing depth in sites with probing attachment loss. *J Clin Periodontol* 1985;12(6):432-40.
139. Lang NP, Adler R, Joss A, Nyman S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol* 1990;17(10):714-21.
140. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 1986;13(6):590-6.
141. Lang NP, Bosshardt DD, Lulic M. Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? *J Clin Periodontol* 2011;38 Suppl 11:182-7.
142. Lopez-Piriz R, Morales A, Gimenez MJ, Bowen A, Carroquino R, Aguilar L, et al. Correlation between clinical parameters characterising peri-implant and periodontal health: a practice-based research in Spain in a series of patients with implants installed 4-5 years ago. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;17(5):e893-901.
143. Luterbacher S, Mayfield L, Bragger U, Lang NP. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clin Oral Implants Res* 2000;11(6):521-9.
144. Casado P, Villas-Boas, R. Is bleeding on probing a differential diagnosis between periimplant health and disease? *Braz J Oral Sci.* 2013; 12(2):95-99.
145. Lang NP. Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention and Therapy of Mucositis and Peri-implantitis. *Forum implantologicum* 2008;4(2):62-73.

146. Schmidlin K, Schnell N, Steiner S, Salvi GE, Pjetursson B, Matuliene G, et al. Complication and failure rates in patients treated for chronic periodontitis and restored with single crowns on teeth and/or implants. *Clin Oral Implants Res*; 21(5):550-7.
147. Rutar A, Lang NP, Buser D, Burgin W, Mombelli A. Retrospective assessment of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(3):189-95.
148. Klinge B, Meyle J. Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clin Oral Implants Res* 2012;23 Suppl 6:108-10.
149. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1(1):11-25.
150. Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Branemark PI, Eriksson B, Rockler B, et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15(1):53-61.
151. Lang NP. How do we detect peri-implantitis? *Forum implantologicum* 2013;9(1):6-11.
152. Heitz-Mayfield LJA. How Wo We Treat Peri-Implantitis. *Forum implantologicum* 2013;9(1):24-29.
153. Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res* 2009;88(12):1065-76.
154. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontol Res* 1966;1(3):193-204.
155. Lindhe J, Ericsson I. Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *J Periodontol* 1978;49(7):343-50.
156. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 1992;3(1):9-16.
157. Schou S, Holmstrup P, Kornman KS. Non-human primates used in studies of periodontal disease pathogenesis: a review of the literature. *J Periodontol* 1993;64(6):497-508.
158. Karimbux NY, Sirakian A, Weber HP, Nishimura I. A new animal model for molecular biological analysis of the implant-tissue interface: spatial expression of type XII collagen mRNA around a titanium oral implant. *J Oral Implantol* 1995;21(2):107-13; discussion 14-5.
159. 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. *J Periodontol* 2011;82(5):778-89.
160. Atsuta I, Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Jinno Y, Koyano K. Evaluations of epithelial sealing and peri-implant epithelial down-growth around "step-type" implants. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(4):459-66.
161. Knoernschild KL, Lefebvre CA, Schuster GS, Payant LM, Gagnon FM. Endotoxin adherence to and elution from two casting alloys. *Int J Prosthodont* 1994;7(1):22-9.
162. Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant *Biomaterials*. *J Prosthet Dent* 1997;77(1):76-82.
163. Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000* 2002;28:177-89.
164. Shibli JA, Theodoro LH, Haypek P, Garcia VG, Marcantonio E. The effect of CO(2) laser irradiation on failed implant surfaces. *Implant Dent* 2004;13(4):342-51.
165. Salmeron S, Rezende ML, Consolaro A, Sant'ana AC, Damante CA, Greggi SL, et al. Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* 2013;84(5):641-9.
166. Mueller CK, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Analysis of inflammatory periimplant lesions during a 12-week period of undisturbed plaque accumulation--a comparison between flapless and flap surgery in the mini-pig. *Clin Oral Investig* 2012;16(2):379-85.
167. Becker ST, Dorfer C, Graetz C, De Buhr W, Wiltfang J, Podschun R. A pilot study: microbiological conditions of the oral cavity in minipigs for peri-implantitis models. *Lab Anim* 2011;45(3):179-83.

168. Singh G, O'Neal RB, Brennan WA, Strong SL, Horner JA, Van Dyke TE. Surgical treatment of induced peri-implantitis in the micro pig: clinical and histological analysis. *J Periodontol* 1993;64(10):984-9.
169. Hickey JS, O'Neal RB, Scheidt MJ, Strong SL, Turgeon D, Van Dyke TE. Microbiologic characterization of ligature-induced peri-implantitis in the microswine model. *J Periodontol* 1991;62(9):548-53.
170. Karagianes MT, Westerman RE, Rasmussen JJ, Marshall RP. Development and evaluation of porous ceramic and titanium alloy dental anchors implanted in miniature swine. *J Biomed Mater Res* 1974;8(4 Pt 2):391-9.
171. Weaver ME, Sorenson FM, Jump EB. The miniature pig as an experimental animal in dental research. *Arch Oral Biol* 1962;7:17-23.
172. Linares A, Domken O, Dard M, Blanco J. Peri-implant soft tissues around implants with a modified neck surface. Part I. Clinical and histometric outcomes: a pilot study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2013;40(4):412-20.
173. Nkenke E, Fenner M, Vairaktaris EG, Neukam FW, Radespiel-Troger M. Immediate versus delayed loading of dental implants in the maxillae of minipigs. Part II: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(4):540-6.
174. Sun P, Wang J, Zheng Y, Fan Y, Gu Z. BMP2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration in peri-implant bone defects model than BMP2 or BMP7 homodimer. *Dent Mater J* 2012;31(2):239-48.
175. Park J, Lutz R, Felszeghy E, Wiltfang J, Nkenke E, Neukam FW, et al. The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials* 2007;28(17):2772-82.
176. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999;26(6):335-40.
177. Lindhe J, Hamp SE, Loe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Periodontol Res* 1975;10(5):243-55.
178. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994;65(12):1158-68.
179. Martins O, Ramos JC, Baptista IP, Dard MM. The dog as a model for peri-implantitis. A review. *J Invest Surg* 2014;27(1):50-6.
180. Syed SA, Svanberg M, Svanberg G. The predominant cultivable dental plaque flora of beagle dogs with periodontitis. *J Clin Periodontol* 1981;8(1):45-56.
181. Attstrom R, Graf-de Beer M, Schroeder HE. Clinical and histologic characteristics of normal gingiva in dogs. *J Periodontol Res* 1975;10(3):115-27.
182. Lindhe J, Hamp S, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontol Res* 1973;8(1):1-10.
183. Martin RK, Albright JP, Jee WS, Taylor GN, Clarke WR. Bone loss in the beagle tibia: influence of age, weight, and sex. *Calcif Tissue Int* 1981;33(3):233-8.
184. Hurzeler MB, Quinones CR, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part I: Clinical findings and histologic observations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10(4):474-84.
185. Grunder U, Hurzeler MB, Schupbach P, Strub JR. Treatment of ligature-induced peri-implantitis using guided tissue regeneration: a clinical and histologic study in the beagle dog. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(3):282-93.
186. Marinello CP, Berglundh T, Ericsson I, Klinge B, Glantz PO, Lindhe J. Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *J Clin Periodontol* 1995;22(6):475-9.
187. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, et al. Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(5):535-47.
188. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, et al. Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(4):412-22.

189. Schou S, Holmstrup P, Jorgensen T, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Wenzel A. Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. I. Clinical and radiographic observations in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(4):391-403.
190. Caton J, Mota L, Gandini L, Laskaris B. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol* 1994;65(12):1143-50.
191. Caton JG, Kowalski CJ. Primate model for testing periodontal treatment procedures: II. Production of contralaterally similar lesions. *J Periodontol* 1976;47(9):506-10.
192. Bragger U, Burgin W, Lang NP, Buser D. Digital subtraction radiography for the assessment of changes in peri-implant bone density. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1991;6(2):160-6.
193. Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Kornman KS. Ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth. *Clin Oral Implants Res* 1993;4(1):12-22.
194. Lang NP, Bragger U, Walther D, Beamer B, Kornman KS. Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clin Oral Implants Res* 1993;4(1):2-11.
195. Fritz ME, Braswell LD, Koth D, Jeffcoat M, Reddy M, Cotsonis G. Experimental peri-implantitis in consecutively placed, loaded root-form and plate-form implants in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol* 1997;68(11):1131-5.
196. Isidor F. Clinical probing and radiographic assessment in relation to the histologic bone level at oral implants in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(4):255-64.
197. Eke PI, Braswell LD, Fritz ME. Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol* 1998;69(2):190-4.
198. Schou S, Holmstrup P, Skovgaard LT, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Gundersen HJ. Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. II. Stereologic and histologic observations in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(4):404-11.
199. Miyata T, Kobayashi Y, Araki H, Ohto T, Shin K. The influence of controlled occlusal overload on peri-implant tissue. part 4: a histologic study in monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(3):384-90.
200. Hurzeler MB, Quinones CR, Kohal RJ, Rohde M, Strub JR, Teuscher U, et al. Changes in peri-implant tissues subjected to orthodontic forces and ligature breakdown in monkeys. *J Periodontol* 1998;69(3):396-404.
201. Warrar K, Buser D, Lang NP, Karring T. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. *Clin Oral Implants Res* 1995;6(3):131-8.
202. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(6): e1000097. 2009.
203. Borg E, Grondahl K, Persson LG, Grondahl HG. Marginal bone level around implants assessed in digital and film radiographs: in vivo study in the dog. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000;2(1):10-7.
204. Assenza B, Artese L, Scarano A, Rubini C, Perrotti V, Piattelli M, et al. Screw vs cement-implant-retained restorations: an experimental study in the beagle. Part 2. Immunohistochemical evaluation of the peri-implant tissues. *J Oral Implantol* 2006;32(1):1-7.
205. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Kikuchi S, Oda S, Ishikawa I. Er:YAG laser therapy for peri-implant infection: a histological study. *Lasers Med Sci* 2007;22(3):143-57.
206. Yamamoto A, Tanabe, T. Treatment of peri-implantitis around TiUnite-surface implants using Er:YAG laser microexplosions. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33(1):21-30.
207. Schupbach P, Hurzeler M, Grunder U. Implant-tissue interfaces following treatment of peri-implantitis using guided tissue regeneration: a light and electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(2):55-65.
208. Weber HP, Fiorellini JP, Paquette DW, Howell TH, Williams RC. Inhibition of peri-implant bone loss with the nonsteroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen in beagle dogs. A preliminary study. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(3):148-53.
209. Hurzeler MB, Quinones CR, Schupbach P, Morrison EC, Caffesse RG. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: Histologic findings. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(2):168-75.

210. Tillmanns HW, Hermann JS, Cagna DR, Burgess AV, Meffert RM. Evaluation of three different dental implants in ligature-induced peri-implantitis in the beagle dog. Part I. Clinical evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(5):611-20.
211. Tillmanns HW, Hermann JS, Tiffée JC, Burgess AV, Meffert RM. Evaluation of three different dental implants in ligature-induced peri-implantitis in the beagle dog. Part II. Histology and microbiology. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13(1):59-68.
212. Wetzel AC, Vlassis J, Caffesse RG, Hammerle CH, Lang NP. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(2):111-9.
213. Persson LG, Araujo MG, Berglundh T, Grondahl K, Lindhe J. Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(3):195-203.
214. Shibutani T, Inuduka A, Horiki I, Luan Q, Iwayama Y. Bisphosphonate inhibits alveolar bone resorption in experimentally-induced peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(2):109-14.
215. 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. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(6):595-603.
216. Comut AA, Weber HP, Shortkroff S, Cui FZ, Spector M. Connective tissue orientation around dental implants in a canine model. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(5):433-40.
217. Gotfredsen K, Berglundh T, Lindhe J. Bone reactions at implants subjected to experimental peri-implantitis and static load. A study in the dog. *J Clin Periodontol* 2002;29(2):144-51.
218. Deppe H, Greim H, Brill T, Wagenpfeil S. Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(5):707-14.
219. Persson LG, Mouhyi J, Berglundh T, Sennerby L, Lindhe J. Carbon dioxide laser and hydrogen peroxide conditioning in the treatment of periimplantitis: an experimental study in the dog. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004;6(4):230-8.
220. Zechner W, Kneissel M, Kim S, Ulm C, Watzek G, Plenck H, Jr. Histomorphometrical and clinical comparison of submerged and nonsubmerged implants subjected to experimental peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(1):23-33.
221. Sennerby L, Persson LG, Berglundh T, Wennerberg A, Lindhe J. Implant stability during initiation and resolution of experimental periimplantitis: an experimental study in the dog. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7(3):136-40.
222. Schwarz F, Jepsen S, Herten M, Sager M, Rothamel D, Becker J. Influence of different treatment approaches on non-submerged and submerged healing of ligature induced peri-implantitis lesions: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2006;33(8):584-95.
223. Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(2):161-70.
224. Berglundh T, Gotfredsen K, Zitzmann NU, Lang NP, Lindhe J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(5):655-61.
225. Kozlovsky A, Tal H, Laufer BZ, Leshem R, Rohrer MD, Weinreb M, et al. Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(5):601-10.
226. Martines RT, Sendyk WR, Gromatzky A, Cury PR. Sandblasted/acid-etched vs smooth-surface implants: implant clinical reaction to experimentally induced peri-implantitis in Beagle dogs. *J Oral Implantol* 2008;34(4):185-9.
227. 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. *J Clin Periodontol* 2011;38(10):939-49.
228. Golubovic V, Mihatovic I, Becker J, Schwarz F. Accuracy of cone-beam computed tomography to assess the configuration and extent of ligature-induced peri-implantitis defects. A pilot study. *Oral Maxillofac Surg* 2012;16(4):349-54.
229. Lopez-Piriz R, Sola-Linares E, Granizo JJ, Diaz-Guemes I, Enciso S, Bartolome JF, et al. Radiologic evaluation of bone loss at implants with biocide coated titanium abutments: a study in the dog. *PLoS One* 2012;7(12):e52861.
230. Fan X, Wang Z, Ji P, Bian Y, Lan J. rgpA DNA vaccine induces antibody response and prevents alveolar bone loss in experimental peri-implantitis. *J Periodontol* 2013;84(6):850-6.

231. Madi M, Zakaria O, Noritake K, Fuji M, Kasugai S. Peri-implantitis progression around thin sputtered hydroxyapatite-coated implants: clinical and radiographic evaluation in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28(3):701-9.
232. Cook SD, Rust-Dawicki AM. In vivo evaluation of CSTi dental implants in the presence of ligature-induced peri-implantitis. *J Oral Implantol* 1995;21(3):191-200.
233. Machado MA, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW, Tramontina VA, Nociti Junior FH. Treatment of ligature-induced peri-implantitis defects by regenerative procedures: a clinical study in dogs. *J Oral Sci* 1999;41(4):181-5.
234. Machado MA, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW, Tramontina VA, Nogueira-Filho GR, et al. Treatment of ligature-induced peri-implantitis defects by regenerative procedures. Part II: A histometric study in dogs. *J Oral Sci* 2000;42(3):163-8.
235. Nociti FH, Jr., Caffesse RG, Sallum EA, Machado MA, Stefani CM, Sallum AW. Evaluation of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects: a morphometric study in dogs. *J Oral Implantol* 2000;26(4):244-9.
236. Nociti FH, Jr., Machado MA, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. Part I. A clinical investigation. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(2):115-20.
237. Nociti Junior FH, Caffesse RG, Sallum EA, Machado MA, Stefani CM, Sallum AW. Clinical study of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. *Braz Dent J* 2001;12(2):127-31.
238. Nociti FH, Jr., Cesco De Toledo R, Machado MA, Stefani CM, Line SR, Goncalves RB. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(4):295-300.
239. Nociti FH, Jr., Machado MA, Stefani CM, Sallum EA. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: a histometric investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(5):646-52.
240. Shibli JA, Martins MC, Nociti FH, Garcia VG, Marcantonio E. Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. *J Periodontol* 2003;74(3):338-45.
241. Shibli JA, Martins MC, Lotufo RF, Marcantonio E, Jr. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18(3):383-90.
242. Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. *J Oral Sci* 2003;45(1):17-23.
243. Martins MC, Abi-Rached RS, Shibli JA, Araujo MW, Marcantonio E. Experimental peri-implant tissue breakdown around different dental implant surfaces: clinical and radiographic evaluation in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(6):839-48.
244. Martins MC, Shibli JA, Abi-Rached RS, Marcantonio E, Jr. Progression of experimental chronic peri-implantitis in dogs: clinical and radiographic evaluation. *J Periodontol* 2005;76(8):1367-73.
245. Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH, Marcantonio E. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(3):273-81.
246. You TM, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Lee SH, Huh JY, et al. Treatment of experimental peri-implantitis using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(1):34-7.
247. 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. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(4):391-9.
248. Levin L, Zigdon H, Coelho PG, Suzuki M, Machtei EE. Reimplantation of dental implants following ligature-induced peri-implantitis: a pilot study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013;15(1):1-6.
249. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Edlund T, Lindhe J. The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(4):320-8.
250. Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Guided bone regeneration in the treatment of periimplantitis. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(4):366-72.

251. Persson LG, Ericsson I, Berglundh T, Lindhe J. Osseointegration following treatment of peri-implantitis and replacement of implant components. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2001;28(3):258-63.
252. Zitzmann NU, Berglundh T, Ericsson I, Lindhe J. Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. *J Clin Periodontol* 2004;31(10):845-9.
253. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, et al. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol* 2005;76(8):1275-81.
254. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(10):997-1002.
255. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs II: histological observations. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(4):366-71.
256. Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Implant surface characteristics influence the outcome of treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2011;38(1):58-64.
257. Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2012;39(2):182-7.
258. Carcuac O, Abrahamsson I, Albouy JP, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(4):363-71.
259. Aoki M, Takanashi K, Matsukubo T, Yajima Y, Okuda K, Sato T, et al. Transmission of periodontopathic bacteria from natural teeth to implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14(3):406-11.
260. Faggion CM, Jr., Chambrone L, Gondim V, Schmitter M, Tu YK. Comparison of the effects of treatment of peri-implant infection in animal and human studies: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(2):137-47.
261. Vignoletti F, Abrahamsson I. Quality of reporting of experimental research in *Implant Dentistry*. Critical aspects in design, outcome assessment and model validation. *J Clin Periodontol* 2012;39 (Suppl 12):6-27.
262. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Gene Med* 2010;12(7):561-3.
263. Klinge B. Implants in relation to natural teeth. *J Clin Periodontol* 1991;18(6):482-7.
264. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 2002;13(1):1-19.
265. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
266. Dahlen G, Charalampakis G, Abrahamsson I, Bengtsson L, Falsen E. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *J Periodontol Res* 2012;47(3):354-64.
267. Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol* 2011;38 (Suppl 11):188-202.
268. Pettersson K, Mengel R. Comments on the statistical analysis of the paper by Albouy et al comparing four different types of implants with respect to 'spontaneous' progression of peri-implantitis. *Eur J Oral Implantol* 2011;4(1):9-10.
269. Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 2007;334(7586):197.
270. Berglundh T, Stavropoulos A. Preclinical in vivo research in *Implant Dentistry*. Consensus of the eighth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* 2012;39 (Suppl 12):1-5.
271. Klinge B. Peri-implant marginal bone loss: an academic controversy or a clinical challenge? *Eur J Oral Implantol* 2012; Suppl 5:S13-9.
272. Mombelli A, Decaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol* 2011;38 (Suppl 11):203-13.

273. Ke X, Kennedy LJ, Short AD, Seppala EH, Barnes A, Clements DN, et al. Assessment of the functionality of genome-wide canine SNP arrays and implications for canine disease association studies. *Anim Genet* 2010; 42 (2): 181-90.
274. Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol* 2012; Suppl 5:S21-41.
275. Caramês J. Contribuição para o estudo do comportamento biomecânico de diferentes modelos de implantes endósseos - estudo experimental no cão Beagle. [Doutoramento]. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2001.
276. Albuquerque C, Morinha F, Requicha J, Martins T, Dias I, Guedes-Pinto H, et al. Canine periodontitis: the dog as an important model for periodontal studies. *Vet J* 2012; 191(3):299-305.
277. Niemiec B, editor. *Veterinary Periodontology*: Wiley-Blackwell; 2012; Vol. 1; 358: 4-14.
278. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13(5):611-9.
279. Fischer K, Stenberg T. Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implant-supported full-arch maxillary prostheses. Part I: sandblasted and acid-etched implants and mucosal tissue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011; 14(6):808-15.
280. Buser D, Broggin N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004; 83(7):529-33.
281. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25(4):229-35.
282. Lindhe J, Lang, N., Karring, T., editor. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Wiley-Blackwell; 2008; Vol. 1: 129-131.
283. Donath K BG. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11(4):318-26.
284. Cochran DL, Nummikoski PV, Schoolfield JD, Jones AA, Oates TW. A prospective multicenter 5-year radiographic evaluation of crestal bone levels over time in 596 dental implants placed in 192 patients. *J Periodontol* 2009; 80(5):725-33.
285. Thoma DS, Martin IS, Muhlemann S, Jung RE. Systematic review of pre-clinical models assessing implant integration in locally compromised sites and/or systemically compromised animals. *J Clin Periodontol* 2012; 39 (Suppl 12):37-62.
286. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13:1-10.
287. Dard M. Animal models for experimental surgical research in Implant Dentistry. In: *Implant Dentistry Research Guide: Basic, Translational and Experimental Clinical Research*. Ballo A, ed. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc.; 2012: 1-32.
288. Dannan A, Alkattan, F. Animal Models in Periodontal Research: A Mini-Review of the Literature. *The Internet Journal of Veterinary Medicine* 2007; 5(1). Retrieved 13 October, 2013, from <<http://ispub.com/IJVM/5/1/3211>>.
289. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1(1):60-8.
290. Goldstein SA. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961:183-92.
291. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999 (Suppl 367):S59-67.
292. Chandna S, Hegde S, Bathla, M. Animal models in Periodontology: a review. *Journal of Oral Health Research* 2011; 2(2):41-46.
293. Russel WMS, Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London UK: Methuen. 1959.
294. Russell WMS, Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Chapter 4: The Sources, Incidence and Removal of Inhumanity: Johns Hopkins University. Retrieved 12 Decembre, 2013, from <http://altweb.jhsph.edu/pubs/book/humane_exp/chap4d>.
295. Corbin JE, Mohrman RK, Wilcke HL. Purebred dogs in nutrition research. *Proc Anim Care Panel* 1962; 12:163-8.
296. Hennet P. Review of studies assessing plaque accumulation and gingival inflammation in dogs. *J Vet Dent* 1999; 16(1):23-9.

297. Hamp SE, Lindberg R. Histopathology of spontaneous periodontitis in dogs. *J Periodontol Res* 1977;12(1):46-54.
298. Berglundh T, Lindhe J, Sterrett JD. Clinical and structural characteristics of periodontal tissues in young and old dogs. *J Clin Periodontol* 1991;18(8):616-23.
299. Klein T. Predisposing factors and gross examination findings in periodontal disease. *Clin Tech Small Anim Pract* 2000;15(4):189-96.
300. Sorensen WP, Loe H, Ramfjord SP. Periodontal disease in the beagle dog. A cross sectional clinical study. *J Periodontol Res* 1980;15(4):380-9.
301. Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(9):1336-41.
302. Kortegaard HE, Eriksen T, Baelum V. Periodontal disease in research beagle dogs--an epidemiological study. *J Small Anim Pract* 2008;49(12):610-6.
303. Bloebaum RD, Merrell M, Gustke K, Simmons M. Retrieval analysis of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. *Clin Orthop Relat Res* 1991(267):97-102.
304. Bloebaum RD, Ota DT, Skedros JG, Mantas JP. Comparison of human and canine external femoral morphologies in the context of total hip replacement. *J Biomed Mater Res* 1993;27(9):1149-59.
305. Kimmel DB, Jee WS. A quantitative histologic study of bone turnover in young adult beagles. *Anat Rec* 1982;203(1):31-45.
306. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(1):E47-51.
307. Veterinária DGAe. Proteção Animal; Animais para fins experimentais; Dados estatísticos anuais: Ministério da Agricultura e do Mar, Governo de Portugal; 2013. Retrieved 10 October, 2013, from <<http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=1149097&cboui=1149097>>.
308. Fowler JR, Perkins TA, Buttaro BA, Truant AL. Bacteria adhere less to barbed monofilament than braided sutures in a contaminated wound model. *Clin Orthop Relat Res* 2013;471(2):665-71.
309. Augthun M, Conrads G. Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(1):106-12.
310. Salvi GE, Aglietta M, Eick S, Sculean A, Lang NP, Ramseier CA. Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(2):182-90.
311. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000* 2010;53:167-81.
312. Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1992;3(3):99-103.
313. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res* 1993;72(9):1304-9.
314. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 1995;22(1):1-14.
315. Lesaffre E, Garcia Zattera MJ, Redmond C, Huber H, Needleman I. Reported methodological quality of split-mouth studies. *J Clin Periodontol* 2007;34(9):756-61.
316. Loureiro LMJ, Gameiro MGH. Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística *Revista de Enfermagem Referência* 2011; 3: 151-62.
317. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-35.
318. Lindquist LV, Rockler B, Carlsson GE. Bone resorption around fixtures in edentulous patients treated with mandibular fixed tissue-integrated prostheses. *J Prosthet Dent* 1988;59(1):59-63.
319. Shick RAA. Evaluation of the vertical method of toothbrushing. *J Periodontol* 1961:342-46.

320. Carranza Jr. FA, editor. Periodontologia Clínica de Glickman: Nueva Editorial Interamericana, S.A.; 1990; Vol. página 328.
321. Quirynen M, van Steenberghe D. Is early plaque growth rate constant with time? *J Clin Periodontol* 1989;16(5):278-83.
322. Dhir S. Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol* 2013;17(1):5-11.
323. Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):456-61.
324. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue response to plaque formation at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(2):73-9.
325. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol* 1995;22(3):255-61.
326. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23(2):327-34.
327. Wennerberg A, Sennerby L, Kultje C, Lekholm U. Some soft tissue characteristics at implant abutments with different surface topography. A study in humans. *J Clin Periodontol* 2003;30(1):88-94.
328. Yamane K, Ayukawa Y, Takeshita T, Furuhashi A, Yamashita Y, Koyano K. Bacterial adhesion affinities of various implant abutment materials. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(12):1310-5.
329. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 1998;25(9):721-7.
330. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1992;3(1):1-8.
331. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
332. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 1994;5(4):254-9.
333. Berglundh T, Abrahamsson I, Welander M, Lang NP, Lindhe J. Morphogenesis of the peri-implant mucosa: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(1):1-8.
334. Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol* 2003;30(1):14-8.
335. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M. Histologic observations on 230 retrieved dental implants: 8 years' experience (1989-1996). *J Periodontol* 1998;69(2):178-84.
336. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):251-62.
337. Berglundh T, Abrahamsson I, Lindhe J. Bone reactions to longstanding functional load at implants: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2005;32(9):925-32.
338. Abrahamsson I, Berglundh T, Wennstrom J, Lindhe J. The peri-implant hard and soft tissues at different implant systems. A comparative study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(3):212-9.
339. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(4):381-92.
340. Abrahamsson I, Berglundh T, Moon IS, Lindhe J. Peri-implant tissues at submerged and non-submerged titanium implants. *J Clin Periodontol* 1999;26(9):600-7.
341. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(10):975-82.
342. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5(1):31-8.
343. Mombelli A. Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* 1993;7(2):202-6.
344. Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 2002;13(4):349-58.

345. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(1):25-37.
346. Kumar PS MM, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. 2012;39(5):425-33.
347. da Silva ES, Feres M, Figueiredo LC, Shibli JA, Ramiro FS, Faveri M. Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. *Clin Oral Implants Res*. 00, 2013, 1-8. doi: 10.1111/cir.12231.
348. Charalampakis G, Abrahamsson I, Carcuac O, Dahlen G, Berglundh T. Microbiota in experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 00, 2013, 1-6. doi: 10.1111/cir.12235.
349. Hanisch O, Cortella CA, Boskovic MM, James RA, Slots J, Wikesjo UM. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. *J Periodontol* 1997;68(1):59-66.
350. Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol* 1991;10(1):11-8.
351. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999;10(5):339-45.
352. Maximo MB, de Mendonca AC, Renata Santos V, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(1):99-108.
353. Schou S, Holmstrup P, Keiding N, Fiehn NE. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res* 1996;7(3):190-200.
354. Tamura N, Ochi M, Miyakawa H, Nakazawa F. Analysis of bacterial flora associated with peri-implantitis using obligate anaerobic culture technique and 16S rDNA gene sequence. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28(6):1521-9.
355. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(3):135-44.
356. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 2006;42:47-79.
357. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res* 2005;84(4):340-4.
358. George K, Zafiroopoulos GG, Murat Y, Hubertus S, Nisengard RJ. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J Periodontol* 1994;65(8):766-70.
359. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12-55.
360. Grover HS SS. Microbiology of dental Implants: A Review of the Literature. *Int J Oral Implantol Clin Res* 2012;3(1):43-46.
361. Takanashi K, Kishi M, Okuda K, Ishihara K. Colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions. *Bull Tokyo Dent Coll* 2004;45(2):77-85.
362. Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(5):696-702.
363. Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, van der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W, et al. 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 Periodontol Res* 2012;47(5):616-25.
364. Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Persson GR. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(1):1-7.
365. Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol* 2005;76(9):1490-5.
366. Emrani J, Chee W, Slots J. Bacterial colonization of oral implants from nondental sources. *Clin Implant Dent Relat Res* 2009;11(2):106-12.
367. Persson GR, Samuelsson E, Lindahl C, Renvert S. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a single-blinded randomized longitudinal clinical study. II. Microbiological results. *J Clin Periodontol*;37(6):563-73.

368. Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent* 2006;15(3):298-304.
369. Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005;32(7):778-83.
370. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004;31(12):1061-9.
371. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003;41(11):4950-4.
372. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005;38:135-87.
373. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008;87(11):1016-20.
374. Santagati M, Scillato M, Patane F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65(1):23-31.
375. Loozen G, Ozcelik O, Boon N, De Mol A, Schoen C, Quirynen M, et al. Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. *J Clin Periodontol* 2014;41(1):1-10.
376. Hellstrom MK, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996;23(10):934-40.
377. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987;95(5):369-80.
378. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97(6):1311-8.
379. Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003;185(11):3400-9.
380. Palmer RJ, Jr., Wu R, Gordon S, Bloomquist CG, Liljemark WF, Kilian M, et al. Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol* 2001;337:393-403.
381. Otten JE, Wiedmann-Al-Ahmad M, Jahnke H, Pelz K. Bacterial colonization on different suture materials--a potential risk for intraoral dentoalveolar surgery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74(1):627-35.
382. Leknes KN, Selvig KA, Boe OE, Wikesjo UM. Tissue reactions to sutures in the presence and absence of anti-infective therapy. *J Clin Periodontol* 2005;32(2):130-8.
383. Meyle J. Suture Materials and Suture Techniques. *Periodontal Practice Today* 2006;3(4):253-68.
384. Selvig KA, Biagiotti GR, Leknes KN, Wikesjo UM. Oral tissue reactions to suture materials. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(5):474-87.
385. Chvartzaid D, Koka S. On manufactured diseases, healthy mouths and infected minds. *Int J Prosthodont* 2011;24(2):102-3.
386. Schatzle M, Loe H, Lang NP, Burgin W, Anerud A, Boysen H. The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004;31(12):1122-7.
387. Lang NP, Schatzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009;36 (Suppl 10):3-8.
388. Sanz M, van Winkelhoff AJ. Periodontal infections: understanding the complexity-Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2011;38 (Suppl 11):3-6.
389. Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlen G. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 1992;3(3):112-9.
390. van Steenberghe D, Naert I, Jacobs R, Quirynen M. Influence of inflammatory reactions vs. occlusal loading on peri-implant marginal bone level. *Adv Dent Res* 1999;13:130-5.

391. Becker W. Osseointegration: have we tinkered with the process too much? *Clin Implant Dent Relat Res* 2012; 14(6):779-80.
392. Glauser R, Schupbach P, Gottlow J, Hammerle CH. Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: A light-microscopic overview and histometric analysis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005;7 (Suppl 1):S44-51.
393. Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I. The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol* 1994;21(3):189-93.
394. Buser D, Weber HP, Donath K, Fiorellini JP, Paquette DW, Williams RC. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol* 1992;63(3):225-35.
395. Pollanen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000* 2003;31:12-31.
396. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000* 2000;24:9-27.
397. Matsuo M, Takahashi K. Scanning electron microscopic observation of microvasculature in periodontium. *Microsc Res Tech* 2002;56(1):3-14.
398. Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1997;68(2):186-98.
399. Akagawa Y, Takata T, Matsumoto T, Nikai H, Tsuru H. Correlation between clinical and histological evaluations of the peri-implant gingiva around the single-crystal sapphire endosseous implant. *J Oral Rehabil* 1989;16(6):581-7.
400. Liljenberg B, Gualini F, Berglundh T, Tonetti M, Lindhe J. Composition of plaque-associated lesions in the gingiva and the peri-implant mucosa in partially edentulous subjects. *J Clin Periodontol* 1997;24(2):119-23.
401. Liljenberg B, Gualini F, Berglundh T, Tonetti M, Lindhe J. Some characteristics of the ridge mucosa before and after implant installation. A prospective study in humans. *J Clin Periodontol* 1996;23(11):1008-13.
402. Schwarz F, Bieling K, Nuesry E, Sculean A, Becker J. Clinical and histological healing pattern of peri-implantitis lesions following non-surgical treatment with an Er:YAG laser. *Lasers Surg Med* 2006;38(7):663-71.
403. Nevins M, Kim DM, Jun SH, Guze K, Schupbach P, Nevins ML. Histologic evidence of a connective tissue attachment to laser microgrooved abutments: a canine study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2010;30(3):245-55.
404. Nevins M, Nevins ML, Camelo M, Boyesen JL, Kim DM. Human histologic evidence of a connective tissue attachment to a dental implant. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28(2):111-21.
405. Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J Clin Periodontol* 2004;31(5):341-7.
406. Chavrier CA, Couble ML. Ultrastructural immunohistochemical study of interstitial collagenous components of the healthy human keratinized mucosa surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(1):108-12.
407. Narayanan AS, Clagett JA, Page RC. Effect of Inflammation on the of Collagen Types, I, III, IV, and V and Type I Trimer and Fibronectin in Human Gingivae. *J Dent Res* 1985;64:1111-16.
408. Lindhe J, Lang N, Karring T. editor. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Wiley-Blackwell; 2008; Vol. 1: 8.
409. Brogгинi N, McManus LM, Hermann JS, Medina RU, Oates TW, Schenk RK, et al. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J Dent Res* 2003;82(3):232-7.
410. Brogгинi N, McManus LM, Hermann JS, Medina R, Schenk RK, Buser D, et al. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J Dent Res* 2006;85(5):473-8.
411. Abrahamsson I, Zitzmann NU, Berglundh T, Linder E, Wennerberg A, Lindhe J. The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2002;29(5):448-55.
412. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res* 2006;17 (Suppl 2):55-67.



Capítulo VIII. Anexo

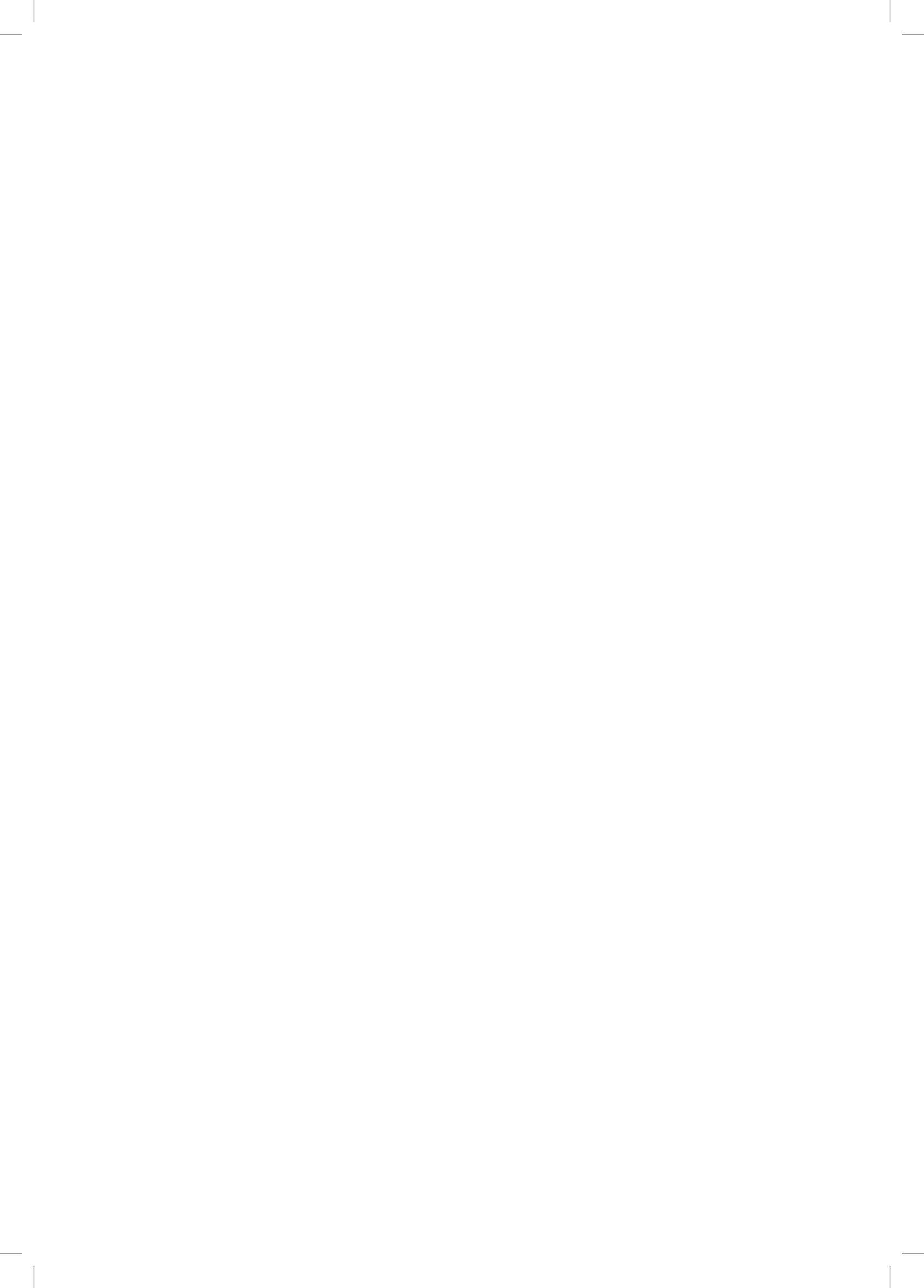


Tabela A – Peso dos cães ao longo do procedimento experimental.

ID Beagle	Primeira Fase Cirúrgica (Extrações)	Segunda Fase Cirúrgica (colocação implantes)	Eutanásia
	peso (Kg)		
93800000399465	16.20	17.30	18.10
93800000395183	16.50	17.70	17.90
93800000385900	18.20	19.70	21.35
93800000359938	16.30	17.30	17.90
93800000366833	16.65	17.55	18.20
93800000392359	18.40	19.50	19.90
média±desvio padrão	17.04±0.99	18.18±1.12	18.89±1.42

Abreviaturas: ID: identificação do número do cão por chip; Kg: quilogramas.

Tabela B – Sequência de primers utilizados para identificação das bactérias.

PCR	Sequência dos primers	Tamanho do amplificação
Bactérias totais	Forward 5'- AAC GCG AAG AAC CTT AC -3'	~430 bp
	Reverse 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'	
<i>Streptococcus spp.</i>	Forward 5'-AGATGGACCTGCGTTGT -3'	~150 bp
	Reverse 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGTCT-3'	
<i>Fusobacterium spp.</i>	Forward 5'-AAGCGCGTCTAGGTGTTATGT-3'	108 bp
	Reverse 5'-TG TAGTTCGCTTACCTCTCCAG-3'	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Forward 5'-AGGCAGCTTGCCACTGCG-3'	404 bp
	Reverse 5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Forward 5'-GCTAATACCGCTAGAGTCGG-3'	443 bp
	Reverse 5'-ATTTACACCTCACTTAAAGGT-3'	
<i>Prevotella intermedia</i>	Forward 5'-CGGTCTGTTAAGCGTGTGTG-3'	100 bp
	Reverse 5'-CACCATGAATCCGCATACG -3'	

Abreviaturas: spp.: Género; *A. actinomycetemcomitans*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabela C – Condições utilizadas nas reacções de PCR para quantificação das bactérias estudadas.

	Desnaturação	Temperatura de emparelhamento	Extensão	Pico de melting	Nº de Ciclos	Concentrações de Primers
<i>Streptococcus spp.</i>	95°C-10s	55°C-5s	72°C-8s	86-87°C	45	0,4 µM
<i>Prevotella intermedia</i>	95°C-10s	59°C-5s	72°C-23s	85°C	45	0,4 µM
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	95°C-10s	57°C-5s	72°C-17s	87-88°C	45	0,4 µM
<i>Fusobacterium spp.</i>	95°C-10s	63°C-5s	72°C-5s	82-83°C	45	0,5 µM
Bactérias Totais	95°C-10s	58°C-5s	72°C-20s	87-88°C	45	0,3 µM
Aa	95°C-10s	58°C-5s	72°C-18s	89-90°C	45	0,4 µM

Abreviaturas: spp.: Género; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabela D – Tabela com valor de p . Comparação intergrupo (IC vs IT) para a variável “presença de placa bacteriana”.

Comparação Intergrupo – Presença de placa bacteriana						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	0,000	0,000	4,5	0,000	5,5	0,000
Z	-4,511	-4,539	-4,04	-4,582	-4,196	-4,586
valor de p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Abreviaturas: U: Teste post-hoc Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

Tabela E – Tabela com o valor de p . Comparação intergrupo para a variável “mucosite peri-implantar”.

Comparação Intergrupo – Mucosite Peri-implantar						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	30,000	6,000	0,000	8,000	0,000	0,000
Z	-3,027	-4,219	-4,511	-3,982	-4,487	-4,529
valor de p	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Abreviaturas: U: Teste post-hoc Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

Tabela F – Tabela com valor de p. Comparação intergrupo (IC vs. IT) para a variável “profundidade de sondagem”.

Comparação Intergrupo – Profundidade de sondagem						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	3,000	41,000	23,000	10,500	8,000	9,000
Z	-4,166	-1,88	-2,989	-3,711	-3,778	-3,784
valor de p	0,000	0,060	0,003	0,000	0,000	0,000

Abreviaturas: U: Teste post-hoc Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% (p<0.05).

Tabela G – Tabela com valor de p. Comparação intergrupo (IC vs. IT) para a variável “hemorragia após sondagem”.

Comparação Intergrupo – Hemorragia após sondagem						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	27,000	15,000	1,000	4,500	1,500	0,000
Z	-3,000	-3,447	-4,357	-4,064	-4,462	-4,522
valor de p	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000

Abreviaturas: U: Teste post-hoc Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% (p<0.05).

Tabela H – Tabela com valor de p. Comparação intergrupo (IC vs. IT) para a variável “nível de inserção clínico”.

Comparação Intergrupo – Nível de inserção clínico						
	S3	S6	S9	S12	S15	S17
U	3,000	41,000	23,000	10,500	8,000	9,000
Z	-4,166	-1,880	-2,989	-3,711	-3,778	-3,784
valor de p	0,000	0,060	0,003	0,000	0,000	0,000

Abreviaturas: U: Teste post-hoc Mann-Whitney; Z: Z-score. Nível de significância de 95% (p<0.05).

Tabela I – Quantidade de bactérias totais (µg (DNA)/ml) detetada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0,609	0,882	0,749	0,463	3,38	1,06	1,39	0,669	33,2	2,17	0,539	0,011
385900	1,32	1,44	0,457	0,583	0,939	1,58	3,68	1,24	4,67	3,21	3,68	0,002
392359	0,426	1,22	1,62	0,452	0,177	0,849	7,32	0,412	2,41	1,09	4,30	0,005
399465	4,89	1	4,18	1,14	0,987	0,921	1,77	0,875	2,87	1,3	3,93	1,74
366833	2,90	4,83	2,60	0,473	1,33	2,48	1,05	0,523	1,16	1,45	9,55	0,313
359938	16,1	1,38	1,19	0,726	0,402	4,85	0,720	0,739	10,4	4,43	1,19	0,002

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela J – Quantidade de *Streptococcus species* (µg (DNA)/ml) detectada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0,141	0,24	0	0	0	0,271	0,215	0	0,186	0,189	0,125	0,126
385900	0,153	0,191	0,232	0,204	0	0,235	0,346	0	0,111	0,122	0,134	0,166
392359	0,154	0,241	0	0	0	0,237	0	0	0,116	0,102	0,114	0,142
399465	0,249	0,138	0,196	0,194	0,215	0,217	0,174	0	0,102	0,111	0,124	0
366833	0,139	0,171	0,245	0,199	0,238	0,262	0	0	0	0,142	0,106	0,103
359938	0,146	0,246	0	0,199	0,296	0,301	0	0	0,104	0,104	0,124	0,103

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela L – Quantidade de *Fusobacterium spp.* (µg (DNA)/ml) detetada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0,00472	0	0,00134	0	0,00308	0,00585	0,00659	0	0,0135	0,00144	0,00219	0
385900	0,00098	0,00396	0,00067	0	0,00491	0,0022	0,0107	0,00022	0,0692	0,00302	0,0048	0
392359	0,00026	0	0,00037	0	0	0	0,0116	0,00022	0,00069	0,00036	0,00243	0
399465	0,00307	0	0,00126	0,00092	0,00116	0,00066	0,00072	0,00046	0,00036	0,00166	0,0011	0
366833	0,0113	0	0,00419	0	0,00652	0,00184	0,00611	0	0,00028	0,00513	0,0047	0,00053
359938	0,0336	0	0,00279	0,00105	0,00147	0,00758	0,00993	0,00044	0,00538	0,00197	0,00289	0,00043

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela M – Quantidade de *Porphyromonas gingivalis* (μg (DNA)/ml) detetada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0,00515	0	0,01	0	0,00665	0,00109	0,00167	0	0,786	1,04	0,00093	5,6E-06
385900	0,0114	0,00718	0,0127	0,00348	7,7E-05	2,5E-06	0,0483	0	1,12	0,162	0,00247	0
392359	0,00525	0	0	0	2,3E-07	2,9E-05	0,0567	1,1E-06	0,00253	0	0,176	5,6E-06
399465	0,00972	0	0,0155	0,00552	0,0004	7,4E-06	0,00012	0	0,00182	0,0151	12,4	0
366833	0,014	0	0,0157	0	0,00327	4,4E-07	0,014	0	0,0244	0,102	6,2	9,9E-05
359938	0,00929	0	0,0123	0,00348	0,00014	0,00214	0,0141	0	0,0408	0,263	0,0424	4,3E-05

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela N – Quantidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (μg (DNA)/ml) detetada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0	0	0	0	0,0101	0,0106	0,0126	0	0,039	0,0333	0,0328	0
385900	0,0126	0	0	0	0,0106	0,0125	0,0099	0	0	0,0328	0	0
392359	0	0	0	0	0	0	0,0251	0	0	0	0,0328	0
399465	0,0126	0	0,024	0,0126	0,0106	0	0,0106	0	0,0328	0	0,0318	0
366833	0,0126	0	0,0126	0	0,0099	0,01	0,0247	0	0,0328	0,0328	0,0328	0
359938	0,0126	0	0,0126	0	0,0011	0,0117	0,0107	0	0,0328	0,0313	0,0328	0

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela O – Quantidade de *Prevotella intermedia* (μg (DNA)/ml) detetada em cada cão, ao longo do período experimental.

ID	Semana 3		Semana 6		Semana 9		Semana 12		Semana 15		Semana 17	
	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC	IT	IC
395183	0,00058	0	0	0	0	0	0	0	0,0112	0	0,0239	0,00381
385900	0	0,00029	0	0	0	0,00025	0,00682	0	0,0315	0,00035	0,0124	0
392359	0,00112	0	0	0	0,0035	0	0	0	0	0	0	0
399465	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
366833	0	0	0	0	0	0,00025	0	0	0	0	0	0
359938	0	0	0,00054	0,001	0,00025	0	0,00027	0,00249	0	0	0	0

Abreviaturas: ID: identificação do cão através do número de chip. IT: implantes teste; IC: implantes controle.

Tabela P – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controle (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável MG-aEJ

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
MG_aEJ_L-MG_aEJ_M	1,500	,913	1,643	,100	,602
MG_aEJ_L-MG_aEJ_V	2,000	,913	2,191	,028	,171
MG_aEJ_L-MG_aEJ_D	2,500	,913	2,739	,006	,037
MG_aEJ_M-MG_aEJ_V	,500	,913	,548	,584	1,000
MG_aEJ_M-MG_aEJ_D	-1,000	,913	-1,095	,273	1,000
MG_aEJ_V-MG_aEJ_D	-,500	,913	-,548	,584	1,000

Abreviaturas: MG-Margem Gingival; aEJ-zona apical do epitélio juncional; M-mesial; D-distal; V-vestibular; L-lingual. Nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Tabela Q – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável MG-aES.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
MG_aES_L-MG_aES_M	1,200	,816	1,470	,142	,850
MG_aES_L-MG_aES_V	2,400	,816	2,939	,003	,020
MG_aES_L-MG_aES_D	2,400	,816	2,939	,003	,020
MG_aES_M-MG_aES_V	1,200	,816	1,470	,142	,850
MG_aES_M-MG_aES_D	-1,200	,816	-1,470	,142	,850
MG_aES_V-MG_aES_D	,000	,816	,000	1,000	1,000

Abreviaturas: MG-Margem Gengival; aES-zona apical do epitélio sulcular; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual. Nível de significância de 95% (p<0.05).

Tabela R – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo Implante Teste (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável CO-aES.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
CO_aES_M-CO_aES_D	-,625	,645	-,968	,333	1,000
CO_aES_M-CO_aES_L	-,875	,645	-1,356	,175	1,000
CO_aES_M-CO_aES_V	2,000	,645	3,098	,002	,012
CO_aES_D-CO_aES_L	-,250	,645	-,387	,699	1,000
CO_aES_D-CO_aES_V	1,375	,645	2,130	,033	,199
CO_aES_L-CO_aES_V	1,125	,645	1,743	,081	,488

Abreviaturas: CO-Crista Óssea; aES-zona apical do epitélio sulcular; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela S – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável CO-aEJ.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
CO_aEJ_M- CO_aEJ_D	-,444	,609	-,730	,465	1,000
CO_aEJ_M- CO_aEJ_L	-,667	,609	-1,095	,273	1,000
CO_aEJ_M- CO_aEJ_V	1,778	,609	2,921	,003	,021
CO_aEJ_D- CO_aEJ_L	-,222	,609	-,365	,715	1,000
CO_aEJ_D- CO_aEJ_V	1,333	,609	2,191	,028	,171
CO_aEJ_L- CO_aEJ_V	1,111	,609	1,826	,068	,407

Abreviaturas: CO-Crista Óssea; aEJ-zona apical do Epitélio Juncional; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela T – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável CO-MG.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
CO_MG_L-CO_MG_M	1,417	,527	2,688	,007	,043
CO_MG_L-CO_MG_D	1,917	,527	3,637	,000	,002
CO_MG_L-CO_MG_V	2,667	,527	5,060	,000	,000
CO_MG_M-CO_MG_D	-,500	,527	-,949	,343	1,000
CO_MG_M-CO_MG_V	1,250	,527	2,372	,018	,106
CO_MG_D-CO_MG_V	,750	,527	1,423	,155	,928

Abreviaturas: CO-Crista Óssea; MG-Margem Gingival; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela U – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável CO-MG

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
CO_MG_L-CO_MG_M	1,400	,577	2,425	,015	,092
CO_MG_L-CO_MG_D	1,500	,577	2,598	,009	,056
CO_MG_L-CO_MG_V	2,700	,577	4,677	,000	,000
CO_MG_M-CO_MG_D	-,100	,577	-,173	,862	1,000
CO_MG_M-CO_MG_V	1,300	,577	2,252	,024	,146
CO_MG_D-CO_MG_V	1,200	,577	2,078	,038	,226

Abreviaturas: CO-Crista Óssea; MG-Margem Gingival; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela V – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável OI-MG

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
OI_MG_L-OI_MG_M	1,545	,550	2,807	,005	,030
OI_MG_L-OI_MG_D	2,091	,550	3,798	,000	,001
OI_MG_L-OI_MG_V	2,364	,550	4,294	,000	,000
OI_MG_M-OI_MG_D	-,545	,550	-,991	,322	1,000
OI_MG_M-OI_MG_V	,818	,550	1,486	,137	,823
OI_MG_D-OI_MG_V	,273	,550	,495	,620	1,000

Abreviaturas: OI-Ombro Implante; MG-Margem Gingival; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela X – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável OI-MG.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
OI_MG_L-OI_MG_M	1,500	,577	2,598	,009	,056
OI_MG_L-OI_MG_D	1,800	,577	3,118	,002	,011
OI_MG_L-OI_MG_V	2,300	,577	3,984	,000	,000
OI_MG_M-OI_MG_D	-,300	,577	-,520	,603	1,000
OI_MG_M-OI_MG_V	,800	,577	1,386	,166	,995
OI_MG_D-OI_MG_V	,500	,577	,866	,386	1,000

Abreviaturas: OI-Ombro do Implante; MG-Margem Gingival; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela Z – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controle (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável OI-CO.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
OI_CO_M-OI_CO_D	-,182	,550	-,330	,741	1,000
OI_CO_M-OI_CO_L	-1,000	,550	-1,817	,069	,416
OI_CO_M-OI_CO_V	1,545	,550	2,807	,005	,030
OI_CO_D-OI_CO_L	-,818	,550	-1,486	,137	,823
OI_CO_D-OI_CO_V	1,364	,550	2,477	,013	,079
OI_CO_L-OI_CO_V	,545	,550	,991	,322	1,000

Abreviaturas: OI-Ombro Implante; CO-Crista Óssea; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela AA – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste (mesial, distal, vestibular e lingual) para a variável OI-CO.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
OI_CO_D-OI_CO_M	,800	,577	1,386	,166	,995
OI_CO_D-OI_CO_L	-1,500	,577	-2,598	,009	,056
OI_CO_D-OI_CO_V	2,100	,577	3,637	,000	,002
OI_CO_M-OI_CO_L	-,700	,577	-1,212	,225	1,000
OI_CO_M-OI_CO_V	1,300	,577	2,252	,024	,146
OI_CO_L-OI_CO_V	,600	,577	1,039	,299	1,000

Abreviaturas: OI-Ombro do Implante; CO-Crista Óssea; M-mesial; D-distal;V-vestibular; L-lingual.

Tabela AB – Média e desvio padrão da variável MG-aINF para o grupo implantes controle (IC) e implantes teste (IT).

	Grupo	Mean (μm)	Std. Deviation	Std. Error Mean
MG_aINF	IC	1847,0336	524,87951	158,25713
	IT	2625,2027	854,89263	257,75983

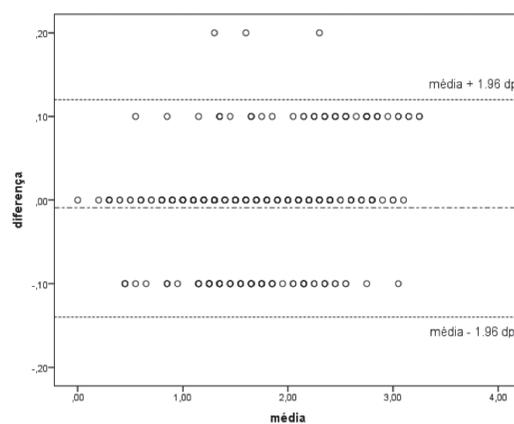


Gráfico A – Gráfico (Bland-Altman) representativo das duas mensurações radiográficas (distância OI-cOI) realizadas com um mês de intervalo.

Listagem de siglas, acrónimos e abreviaturas

- %INF:** Percentagem de infiltrado inflamatório
- 1M:** 1º Molar mandibular esquerdo
- 1PM:** 1º Pré-molar mandibular esquerdo
- 1PM:** 1º Pré-molar maxilar esquerdo
- Aa:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- AE:** Superfície com ataque ácido
- aEJ:** Zona apical do epitélio juncional
- aES:** Zona apical do epitélio sulcular
- aINF:** zona apical do infiltrado inflamatório
- AT:** Azul de toluidina
- B.T.:** Bactérias Totais
- Bf:** *Bacteroides forsythus*
- C:** Córion ou tecido conjuntivo
- Cal:** Cálculo
- CB:** Tomografia computadorizada de feixe cónico (*Cone Beam Computed Tomography*)
- CFRO:** Cone de reabsorção e formação óssea
- CFU:** Unidades formadoras de colónias (*Colony-forming unit*)
- chx:** Digluconato de clorhexidina
- CI:** Componente intra-ósseo
- Cl:** Clínico
- CNS:** Tratamento e cicatrização dos implantes não-submersos
- Co:** Colagénio
- CO:** Crista óssea
- cOI:** Contacto mais coronal entre o osso e o implante
- COI:** Crista óssea-implante
- cPC:** Topo coronal do pilar de cicatrização
- cpTi:** Titânio comercialmente puro
- CSTi:** *Cancelous Structured Titanium*
- CTR:** Controlo
- EJ:** Epitélio juncional
- EOG:** Epitélio oral da gengiva
- ERL:** Laser Er:YAG
- ES:** Epitélio sulcular
- Esp:** Espira do implante
- EWOP:** *Workshop europeu em periodontologia (European Workshop on Periodontology)*
- Fn:** *Fusobacterium nucleatum*

H₂SO₄: Ácido sulfúrico
HA: Superfície de hidroxiapatite
HCl: Ácido clorídrico
HMDir.: Hemimandíbula Direita
HMEsq.: Hemimandíbula Esquerda
HS: Hemorragia após sondagem
Htm.: Histomorfometria
IC: Implantes controlo
ID: Identificação do cão por número de chip
Imp: Implante
INF: Infiltrado inflamatório
IT: Implantes teste
LC: Linha cimentante
Lig-: Período sem ligadura
Lig: Ligadura
Lig+-Lig-: Período com e sem ligadura
Lig+: Período com ligadura
M: Maquinada
M₁: 1º Molar mandibular direito
MG: Margem gengival
mMPI: Margem da mucosa peri-implantar
MPI: Mucosite peri-implantar
mPOM: Média da perda óssea marginal
NIC: Nível de inserção clínico
NMG: Nível da margem gengival
OA: Osso alveolar
Ob: Osteoblasto
ODI: Ombro do implante (radiográfico)
OI: Ombro do implante (histológico)
OS: Tratamento e cicatrização dos implantes submersos
P: Polida
PB: Placa bacteriana
PCM: Gel metronidazol
PCR-RT: Reação da polimerase em cadeia em tempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*)
Pg: *Porphyromonas gingivalis*
PHA: Superfície jateada com plasma de hidroxiapatite
PI: Peri-implantite
Pi: *Prevotella intermedia*

PIC: Perda de inserção clínica
Pil: Pilar do implante
PM: Pré-molar
PM₁: 1º Pré-molar mandibular direito
PM¹: 1º Pré-molar maxilar direito
PMNs: Polimorfonucleares neutrófilos
PPB: Presença de placa bacteriana
PS: Profundidade de Sondagem
r.p.m.: rotações por minuto
ROI: *Region of interest*
RP: *Rete Pegs*
S12: 12ª semana
S15: 15ª semana
S17: 17ª semana
S3: 3ª semana
S6: 6ª semana
S9: 9ª semana
Sa: Rugosidade média
SA: Superfície jacteada/ataque ácido
SLA: Superfície jateada com partículas grossas e submetidas a ataque ácido (*sandblasted acid-etched*)
spp: Género (*species*)
Sup: Supuração
Td: *Treponema denticola*
TiA: Ti₆Al₄V
TiOb: Superfície TiOblast®
TiUn: Superfície TiUnite®;
TO: Tecido ósseo
TOI: Tecido ósseo imaturo
TOL: Tecido ósseo lamelar
TON: Tecido ósseo nativo
TOR: Tecido ósseo de formação recente
TPS: Superfície jateada com plasma de titânio (*titanium plasma-sprayed*)
TST: Teste
U: Teste *post-hoc* Mann-whitney
UI: Grupo sem carga e com ligadura
VUS: Aparelho de ultrassons
Z: Z-score

Listagem de figuras

Figura 2.1 – Diagrama de fluxo da informação ao longo das diferentes fases da revisão, efetuada de acordo com a metodologia PRISMA.....	26
Figura 3.1 – Cronograma do procedimento experimental.....	43
Figura 3.2 – Cão sob anestesia geral e monitorizado.....	44
Figura 3.3 – Imagem radiográfica periapical lateral inferior.....	45
Figura 3.4 – Impressão definitiva mandibular com moldeira individual e silicone.....	46
Figura 3.5 – Equipa cirúrgica durante procedimento operatório.....	47
Figura 3.6 – Guia cirúrgica colocada sobre mandíbula edêntula.....	49
Figura 3.7 – Exposição da crista óssea edêntula após descolamento dos retalhos mucoperiósteos.	49
Figura 3.8 – Início da preparação do leito implantar.....	49
Figura 3.9 – Leitos implantares com brocas cirúrgicas de 2.8mm e 2.2mm.....	49
Figura 3.10 – Preparo final de ambos os leitos implantares.....	49
Figura 3.11 – Colocação do implante I-,M no leito implantar: a) inicial; b) final.....	50
Figura 3.12 – Posição final de ambos os implantes.....	50
Figura 3.13 – Pilares de cicatrização colocados sobre os implantes, com o bisel voltado para a face vestibular.....	50
Figura 3.14 – Sutura com pontos simples utilizando um fio de poliamida.	50
Figura 3.15 – implantes teste com placa bacteriana sobre os pilares.....	53
Figura 3.16 – Controlo radiográfico com recurso a guia radiográfica e sensor intra-oral retroalveolar.	54
Figura 3.17 – Guia radiográfica; posicionamento intra-oral da guia com o sensor.....	54
Figura 3.18 – Cone de papel colocado no sulco peri-implantar da face vestibular do implante.....	55
Figura 3.19 – Dispositivo de agitação para desidratação e infiltração do sistema Exakt®.....	58
Figura 3.20 – Unidade de fotopolimerização com ciclo de luz amarelo e azul.....	58
Figura 3.21 – Unidade de corte do sistema Exakt®.....	58
Figura 3.22 – Micrómetro digital para medição de espessura.....	59
Figura 3.23 – Separação do slide final na unidade de corte.....	59
Figura 3.24 – Imagem de radiovisiografia de dois implantes e respetivos pilares de cicatrização à semana 0.....	60
Figura 3.25 – Imagem histológica representativa dos tecidos peri-implantares e implante.....	62
Figura 3.26 – Imagem histológica com a <i>Region of Interest</i>	64
Figura 3.27 – Imagem em microscopia de luz de um corte histológico da face vestibular de um implante controlo...	89
Figura 3.28 – Constituição histológica de uma área do epitélio oral da gengiva de um implante controlo.....	90
Figura 3.29 – Margem gengival (vestibular) de implante controlo.....	90
Figura 3.30 – Imagens semelhantes à da figura anterior, em maior ampliação.....	91
Figura 3.31 – Pormenor do epitélio sulcular destacando-se a presença de algumas células inflamatórias.....	91
Figura 3.32 – Aspeto da localização e organização do epitélio juncional relativamente a um implante controlo.....	92
Figura 3.33 – Pormenor do epitélio juncional.....	92
Figura 3.34 – Imagem do tecido conjuntivo associado a uma área do epitélio juncional.....	92
Figura 3.35 – Imagem da constituição histológica da região situada entre a parte mais apical do epitélio juncional e o tecido ósseo marginal.....	93
Figura 3.36 – Pormenor da área de contacto mais coronal osso-implante.....	93
Figura 3.37 – Aspeto da localização, organização e áreas de contacto do tecido ósseo em relação a um implante controlo.....	94

Figura 3.38 – Pormenor de área de tecido ósseo imaturo.....	94
Figura 3.39 – Presença de grande quantidade de tecido ósseo lamelar	95
Figura 3.40 – Imagem de algumas regiões de tecido ósseo imaturo detectadas no espaço existente entre duas espiras	95
Figura 3.41 – Aspeto de um cone de reabsorção e formação óssea	95
Figura 3.42 – Pormenor de uma aparente célula osteoclástica localizada numa lacuna de Howship.....	96
Figura 3.43 – Grande número de células osteoblásticas localizadas numa área de formação óssea.....	96
Figura 3.44 – Existência de uma nítida linha de demarcação entre o tecido ósseo nativo e o tecido ósseo de formação recente.....	96
Figura 3.45 – Presença de uma acentuado infiltrado inflamatório.....	97
Figura 3.46 – Presença de placa bacteriana e cálculos na superfície do pilar transmucoso.....	97
Figura 3.47 – Pormenor do epitélio oral da gengiva.....	98
Figura 3.48 – Aspeto de um grande infiltrado inflamatório com predomínio aparente de perfil linfoplasmocitário.....	98
Figura 3.49 – Aspeto de um grande infiltrado inflamatório situado no sulco peri-implantar e no epitélio sulcular.....	99
Figura 3.50 – Pormenor da presença de placa bacteriana e cálculos situados a nível do pilar de cicatrização.....	99
Figura 3.51 – Existência de grande número de células inflamatórias e hemáceas localizado a nível do colo do implante.	99
Figura 3.52 – Imagem de um infiltrado inflamatório acentuado existente no sulco peri-implantar.....	100
Figura 3.53 – Pormenor da desorganização estrutural das células constituintes do epitélio sulcular	100
Figura 3.54 – Imagem de uma área do córion adjacente ao epitélio sulcular	100
Figura 3.55 – Presença de células com aparente perfil macrófágico e dilatação vascular existente numa zona do córion adjacente ao epitélio sulcular.....	100
Figura 3.56 – Aspeto da considerável densidade de linfócitos e plasmócitos	101
Figura 3.57 – Zonas contíguas de epitélio juncional presente num implante teste	101
Figura 3.58 – Aspeto de elevada densidade de infiltrado inflamatório	101
Figura 3.59 – Presença de um infiltrado inflamatório localizado entre a superfície do implante teste e o tecido conjuntivo adjacente.....	102
Figura 3.60 – Epitélio juncional com considerável infiltrado inflamatório	102
Figura 3.61 – Aspeto da localização, organização e zonas de contacto do tecido ósseo relativamente a um implante teste	103
Figura 3.62 – Região subperiostica contígua a um implante teste	103
Figura 3.63 – Localização do tecido ósseo relativamente ao corpo de um implante teste.....	103
Figura 3.64 – Pormenor da região subperiostica das apófises alveolares de implantes teste	104

Listagem de gráficos

Gráfico 1 – Média da percentagem de PPB ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste.....	68
Gráfico 2 – Média da percentagem de MPI ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste.....	69
Gráfico 3 – Média da PS ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste....	70
Gráfico 4 – Média da percentagem de HS ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste.....	72
Gráfico 5 – Média do NMG ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste..	73
Gráfico 6 – Média do NIC ao longo do procedimento experimental, para os implantes controlo e implantes teste	75
Gráfico 7 – Média da variação da distância ODI-cOI (perda óssea radiográfica), em relação à semana inicial (S0), para o grupo implantes controlo e grupo implantes teste.....	77
Gráfico 8 – Bactérias totais (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	79
Gráfico 9 – <i>Streptococcus spp.</i> (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	80
Gráfico 10 – <i>Fusobacterium spp.</i> (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	81
Gráfico 11 – <i>Porphyromonas gingivalis</i> (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	82
Gráfico 12 – <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	83
Gráfico 13 – <i>Prevotella intermedia</i> (valor médio de DNA em µg/ml de solução) para ambos grupos, ao longo do procedimento experimental.....	84
Gráfico 14 – Média de DNA de bactérias totais no grupo implantes controlo colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar.....	84
Gráfico 15 – Média de DNA de bactérias totais no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar	85
Gráfico 16 – Média de DNA de <i>Streptococcus species</i> no grupo implantes controlo colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar	85
Gráfico 17 – Média de DNA de <i>Streptococcus species</i> no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar	85
Gráfico 18 – Média de DNA de <i>Fusobacterium species</i> no grupo implantes controlo colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar	86
Gráfico 19 – Média de DNA de <i>Fusobacterium spp.</i> no grupo implantes teste colocados na posição do 1º molar e 4º pré-molar	86
Gráfico 20 – Média de DNA de <i>Porphyromonas gingivalis</i> no grupo implantes controlo colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar.....	87
Gráfico 21 – Média de DNA de <i>Porphyromonas gingivalis</i> no grupo implantes teste colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar.....	87
Gráfico 22 – Média de DNA de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> no grupo implantes controlo colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar	87
Gráfico 23 – Média de DNA de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> no grupo implantes teste colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar	88

Gráfico 24 – Média de DNA de <i>Prevotella intermedia</i> no grupo implantes controlo colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar	88
Gráfico 25 – Média de DNA de <i>Prevotella intermedia</i> no grupo implantes teste colocados na posição do 4º pré-molar e colocados na posição do 1º molar	88
Gráfico 26 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (MG-aEJ).....	105
Gráfico 27 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (MG-aES).....	106
Gráfico 28 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (CO-aES).....	107
Gráfico 29 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (CO-aEJ).....	108
Gráfico 30 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (CO-MG).....	109
Gráfico 31 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (OI-MG).....	110
Gráfico 32 – Diagrama de extremos e quartis para as faces vestibular, mesial, distal e lingual dos implantes bem como para a média das quatro faces, por grupo de implantes (OI-CO).....	111
Gráfico 33 – Diagrama de extremos e quartis relativo à distância MG-aINF, para os implantes teste e implantes controlo	111
Gráfico 34 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio juncional, no grupo implantes controlo.....	112
Gráfico 35 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio juncional no grupo implantes teste.....	112
Gráfico 36 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio sulcular, no grupo implantes controlo.....	113
Gráfico 37 – Gráfico de dispersão entre as variáveis profundidade de sondagem e margem gengival-zona apical do epitélio sulcular, no grupo implantes teste.....	113
Gráfico 38 – Gráfico de dispersão entre a distância ombro do implante-crista óssea (radiográfica) e ombro do implante-crista óssea (histológica), no grupo implantes controlo.....	114
Gráfico 39 – Gráfico de dispersão entre a distância ombro do implante-crista óssea (radiográfica) e ombro do implante-crista óssea (histológica), no grupo implantes teste.....	114
Gráfico A – Gráfico (Bland-Altman) representativo das duas mensurações radiográficas (distância OI-cOI) realizadas com um mês de intervalo.....	197

Listagem de tabelas

Tabela 2.1 – Lista de artigos excluídos após leitura integral dos mesmos	26
Tabela 2.2 – Artigos incluídos para análise na revisão	27
Tabela 3.1 – Identificação dos animais.....	42
Tabela 3.2 – Resultado da aleatorização dos implantes pelos grupos controlo ou teste.....	51
Tabela 3.3 – Presença de placa bacteriana ao longo do procedimento experimental para ambos os grupos	67
Tabela 3.4 – Valor de p , para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável PPB.....	67
Tabela 3.5 – Presença de MPI ao longo do procedimento experimental.....	68
Tabela 3.6 – Valor de p para o grupo IT ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável MPI....	69
Tabela 3.7 – Média e desvio padrão da “profundidade de sondagem” ao longo do procedimento experimental.....	69
Tabela 3.8 – Valor de p , para o grupo implantes controlo para variável “profundidade de sondagem” ao longo das semanas de procedimento experimental.....	70
Tabela 3.9 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “profundidade de sondagem”.....	70
Tabela 3.10 – Média e desvio padrão para a variável “hemorragia após sondagem” ao longo do procedimento experimental.....	71
Tabela 3.11 – Valor de p , para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental e para a variável “hemorragia após sondagem”.....	71
Tabela 3.12 – Representação da média e desvio padrão para a variável “nível da margem gengival” ao longo do procedimento experimental.....	72
Tabela 3.13 – Valor de p para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental e para a variável “nível da margem gengival”	72
Tabela 3.14 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível da margem gengival”.....	73
Tabela 3.15 – Representação da média e desvio padrão para a variável “nível de inserção clínico”.....	74
Tabela 3.16 – Valor de p para o grupo implantes controlo, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível de inserção clínico”	74
Tabela 3.17 – Valor de p para o grupo implantes teste, ao longo das semanas de procedimento experimental para a variável “nível de inserção clínico”	74
Tabela 3.18 – Média e desvio padrão para a variável “supuração” ao longo do procedimento experimental para ambos os grupos.....	75
Tabela 3.19 – Média e desvio padrão para a variável ODI-cOI ao longo do procedimento experimental.....	75
Tabela 3.20 – Média e desvio padrão da variação da distância ODI-cOI em relação a S0.....	76
Tabela 3.21 – Valor de p para o grupo implantes controlo para a variável ODI-cOI.....	76
Tabela 3.22 – Valor de p para o grupo implantes teste para a variável OI-cOI.....	76
Tabela 3.23 – Média e desvio padrão da quantidade de DNA para os grupos implantes controlo e implantes teste ...	78
Tabela 3.24 – Valor de p relativo à comparação intergrupos para a variável bactérias totais.....	78
Tabela 3.25 – Valor de p relativo à comparação intergrupos para a variável <i>Streptococcus spp.</i>	79
Tabela 3.26 – Valor de p relativo à comparação intergrupos para a variável <i>Fusobacterium spp.</i>	80
Tabela 3.27 – Valor de p relativo à comparação inter-grupos para a variável <i>Porphyromonas gingivalis.</i>	81
Tabela 3.28 – Valor de p relativo à comparação inter-grupos para a variável <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans.</i>	82

Tabela 3.29 – Valor de <i>p</i> relativo à comparação inter-grupos para a variável <i>Prevotella intermedia</i>	83
Tabela 3.30 – Média das distâncias histológicas entre as distintas referências, para o grupo de implantes controlo....	104
Tabela 3.31 – Média das distâncias histológicas entre as distintas referências, para o grupo de implantes teste.....	105
Tabela 3.32 – Representação dos resultados para as diferentes variáveis nos implantes controlo e implantes teste...	105
Tabela A – Peso dos cães ao longo do procedimento experimental.....	191
Tabela B – Sequência de <i>primers</i> utilizados para identificação das bactérias.....	191
Tabela C – Condições utilizadas nas reacções de PCR para quantificação das bactérias estudadas.....	191
Tabela D – Tabela com valor de <i>p</i> . Comparação intergrupo para a variável “presença de placa bacteriana”.....	191
Tabela E – Tabela com o valor de <i>p</i> . Comparação intergrupo para a variável “mucosite peri-implantar”.....	191
Tabela F – Tabela com valor de <i>p</i> . Comparação intergrupo para a variável “profundidade de sondagem”.....	192
Tabela G – Tabela com valor de <i>p</i> . Comparação intergrupo para a variável “hemorragia após sondagem”.....	192
Tabela H – Tabela com valor de <i>p</i> . Comparação intergrupo para a variável “nível de inserção clínico”.....	192
Tabela I – Quantidade de bactérias totais detetada em cada cão, ao longo do período experimental.....	192
Tabela J – Quantidade de <i>Streptococcus species</i> detectada em cada cão, ao longo do período experimental.....	192
Tabela L – Quantidade de <i>Fusobacterium spp.</i> detetada em cada cão, ao longo do período experimental.....	192
Tabela M – Quantidade de <i>Porphyromonas gingivalis</i> detetada em cada cão, ao longo do período experimental.....	193
Tabela N – Quantidade de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> detetada em cada cão, ao longo do período experimental.....	193
Tabela O – Quantidade de <i>Prevotella intermedia</i> detetada em cada cão, ao longo do período experimental.....	193
Tabela P – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo para a variável MG-aEJ.....	193
Tabela Q – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo para a variável MG-aES.....	194
Tabela R – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo Implante teste para a variável CO-aES.....	194
Tabela S – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste para a variável CO-aEJ.....	194
Tabela T – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo para a variável CO-MG.....	195
Tabela U – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste para a variável CO-MG.....	195
Tabela V – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo para a variável OI-MG.....	195
Tabela X – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste para a variável OI-MG.....	196
Tabela Z – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes controlo para a variável OI-CO.....	196
Tabela AA – Comparações múltiplas entre as várias faces do grupo implantes teste para a variável OI-CO.....	196
Tabela AB – Média e desvio padrão da variável MG-aINF para o grupo implantes controlo e implantes teste.....	197

Capítulo IX. Índice



Sumário	XVII
Capítulo I. Introdução.....	1
I – Doenças peri-implantares	3
I.1 – Perspetiva histórica e critérios de diagnóstico.....	3
I.1.1 – Peri-implantite e mucosite peri-implantar	3
I.1.2 – Diagnóstico diferencial.....	8
I.2 – Prevalência e incidência	9
I.3 – Parâmetros clínicos e radiográficos	12
I.3.1 – Profundidade de sondagem peri-implantar.....	12
I.3.2 – Hemorragia à sondagem.....	15
I.3.3 – Supuração.....	16
I.3.4 – Exame radiográfico	17
I.4 – Modelos animais para estudo da peri-implantite	18
I.4.1 – Rato	19
I.4.2. – “Mini-pig”	20
I.4.3 – Cão	20
I.4.4 – Primatas não-humanos	21
Capítulo II. Avaliação crítica de modelos experimentais canídeos para estudo da peri-implantite ...	23
I.1 – Objetivo	25
I.2 – Estratégia de pesquisa	25
I.3 – Critérios de inclusão e exclusão dos artigos.....	25
I.4 – Resultados.....	25
I.5 – Avaliação crítica dos artigos incluídos	33
I.6 – Conclusão	38

Capítulo III. Estudo experimental	39
1 – Objetivos.....	41
2 – Materiais e métodos.....	42
2.1 – Modelo experimental	42
2.1.1 – Modelo animal	42
2.1.1.1 – Manutenção e bem-estar animal.....	42
2.1.1.2 – Cronograma experimental	43
2.1.2 – Cirurgia experimental	44
2.1.2.1 – Protocolo anestésico e extrações dentárias - Primeira fase cirúrgica.....	44
2.1.2.2 – Impressão para confecção das guias radiográfica e cirúrgica	46
2.1.2.3 – Implantes	47
2.1.2.4 – Cirurgia de colocação dos implantes – Segunda fase cirúrgica.....	47
2.1.2.5 – Aleatorização dos grupos experimentais: “implantes controlo” e “implantes teste”.	51
2.1.3 – Avaliação Pós-cirúrgica.....	51
2.1.3.1 – Protocolo para controlo da placa bacteriana.....	51
2.1.3.2 – Avaliações periódicas.....	52
2.1.3.2.1 – Avaliação clínica	52
2.1.3.2.2 – Avaliação radiográfica.....	54
2.1.3.2.3 – Avaliação microbiológica	55
2.1.4 – Eutanásia dos animais e recolha de amostras para histologia	55
2.2 – Preparação das amostras	56
2.2.1 – Amostras para análise microbiológica.....	56
2.2.2 – Amostras para análise histológica	57
2.3 – Métodos de análise	60
2.3.1 – Análise radiográfica	60
2.3.2 – Análise microbiológica.....	61
2.3.3 – Análise histológica	61
2.3.3.1 – Descrição histológica qualitativa	61
2.3.3.2 – Descrição histológica quantitativa – histomorfometria.....	61
2.3.3.2.1 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ)	63
2.3.3.2.2 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES)	63
2.3.3.2.3 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio sulcular (CO-aES) ...	63
2.3.3.2.4 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio juncional (CO-aEJ)..	63
2.3.3.2.5 – Distância da crista óssea à margem gengival (CO-MG)	63
2.3.3.2.6 – Distância do ombro do implante à margem gengival (OI-MG).....	63
2.3.3.2.7 – Distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO).....	63
2.3.3.2.8 – Distância da margem gengival à zona apical do infiltrado inflamatório (MG-aINF).....	63
2.3.3.2.9 – Percentagem de infiltrado inflamatório (%INF).....	64
2.3.4 – Análise Estatística.....	64

3 – Resultados	66
3.1 – Avaliação do estado de saúde geral dos animais e avaliação clínica da cavidade oral.....	66
3.2 – Análise macroscópica.....	66
3.3 – Cálculo da potência	66
3.4 – Resultados clínicos.....	66
3.4.1 – Presença de placa bacteriana (PPB).....	66
3.4.2 – Mucosite peri-implantar (MPI)	68
3.4.3 – Profundidade de sondagem (PS)	69
3.4.4 – Hemorragia após sondagem (HS).....	71
3.4.5 – Nível da margem gengival (NMG)	72
3.4.6 – Nível de inserção clínico (NIC)	73
3.4.7 – Supuração.....	75
3.5 – Resultados radiográficos.....	75
3.6 – Resultados microbiológicos	77
3.6.1 – Resultados intergrupos: implantes controlo vs implantes teste	77
3.6.1.1 – Bactérias totais.....	77
3.6.1.2 – <i>Streptococcus</i> species (<i>Streptococcus spp.</i>)	79
3.6.1.3 – <i>Fusobacterium</i> species (<i>Fusobacterium spp.</i>)	80
3.6.1.4 – <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)	81
3.6.1.5 – <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa)	82
3.6.1.6 – <i>Prevotella intermedia</i> (Pi)	83
3.6.2 – Resultados intragrupos	84
3.6.2.1 – Bactérias totais	84
3.6.2.2 – <i>Streptococcus</i> species	85
3.6.2.3 – <i>Fusobacterium</i> species	86
3.6.2.4 – <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)	86
3.6.2.5 – <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa)	87
3.6.2.6 – <i>Prevotella intermedia</i> (Pi)	88
3.7 – Avaliação histológica	89
3.7.1 – Avaliação histológica qualitativa.....	89
3.7.1.1 – Grupo implantes controlo.....	89
3.7.1.2 – Grupo implantes teste	97
3.7.2 – Resultados histológicos quantitativos - histomorfometria	104
3.7.2.1 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ).....	104
3.7.2.2 – Distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES).....	106
3.7.2.3 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio sulcular (CO-aES).....	106
3.7.2.4 – Distância da crista óssea à zona apical do epitélio juncional (CO-aEJ).....	107
3.7.2.5 – Distância da crista óssea à margem gengival (CO-MG)	108
3.7.2.6 – Distância do ombro do implante à margem gengival (OI-MG).....	109
3.7.2.7 – Distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO).....	110
3.7.2.8 – Distância da margem gengival à zona apical do infiltrado inflamatório (MG-aINF)	111
3.7.2.9 – Percentagem de infiltrado inflamatório (% INF)	112

3.8 – Correlação entre variáveis.....	112
3.8.1 – Profundidade de sondagem (PS) (variável clínica) versus distância da margem gengival à zona apical do epitélio juncional (MG-aEJ) (variável histológica).....	112
3.8.2 – Profundidade de sondagem (PS) (variável clínica) versus distância da margem gengival à zona apical do epitélio sulcular (MG-aES) (variável histológica).....	113
3.8.3 – Distância do ombro do implante à crista óssea (ODI-aOI) (variável radiográfico) versus distância do ombro do implante à crista óssea (OI-CO) (variável histológica).....	114
4 – Discussão.....	115
5 – Perspetivas futuras.....	154
Capítulo IV. Conclusões.....	155
Capítulo V. Resumo.....	159
Capítulo VI. Abstract.....	163
Capítulo VII. Bibliografia.....	167
Capítulo VIII. Anexo.....	189
Capítulo IX. Índice.....	207