



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ROSSANA REIM DEL' GAUDIO PIGNATARO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DA PRATA COLOIDAL APLICADA EM
IMPLANTES DENTÁRIOS COM PLATAFORMA DO TIPO
HEXÁGONO EXTERNO: estudo *in vitro***

2020

ROSSANA REIM DEL' GAUDIO PIGNATARO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA
PRATA COLOIDAL APLICADA EM IMPLANTES DENTÁRIOS COM
PLATAFORMA DO TIPO HEXÁGONO EXTERNO: estudo *in vitro***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Desempenho de Materiais Reabilitadores Protéticos.

Orientador: Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Júnior

Coorientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pignataro, Rossana Reim Del Gaudio

Atividade antimicrobiana de diferentes concentrações da prata coloidal aplicada em implantes dentários com plataforma do tipo hexágono externo: estudo in vitro / Rossana Reim Del Gaudio Pignataro. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Lafayette Nogueira Júnior

Coorientador: Cristiane Yumi Koga-ito

1. Implantes dentários. 2. Microinfiltração. 3. Microrganismos . 4. Nanopartícula prata. 5. Peri-implantite. I. Nogueira Júnior, Lafayette, orient. II. Koga-ito, Cristiane Yumi, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Junior (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Luís Ronaldo Picosse

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Ciências Biomédicas

Campus São Paulo

Dra. Nathália de Carvalho Ramos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2020

DEDICATÓRIA

Essa minha jornada profissional, eu dedico a Deus, que, mesmo sem eu compreender o porquê das coisas, tem planos para a minha vida e me guia pelos caminhos mais imprevisíveis. Eu confio em Ti!

Aos meus pais, que foram o início de tudo e sempre me ensinaram que estudar nunca é demais, e é herança que ninguém pode tirar.

Ao amor da minha vida e companheiro, Murilo, por sempre estar ao meu lado, mesmo nos meus momentos mais insanos, sendo cúmplice, amoroso e incentivador e que, sem dúvida, foi essencial nessa jornada.

Aos meus filhos, Enzo e Giulia, por toda paciência. Para eles quero ser exemplo de que nunca é tarde para conquistar, basta ter dedicação, foco e objetivo.

Aos meus irmãos, que são presentes de Deus na vida e que sempre têm uma palavra de carinho!!

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Assoc. Rebeca Di Nicoló, e do vice-diretor, Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges.

Ao meu orientador Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Júnior, cujo exemplo de dedicação e sucesso profissional inspira a mais profunda admiração. Muito obrigada pela oportunidade, orientação, amizade e paciência durante todo o curso e por ter me mostrado diferentes caminhos na profissão.

À minha Coorientadora, Profa. Cristiane Yumi Koga-Ito, pelo carinho comigo e o amor com que se dedica aos trabalhos. Uma profissional como você não se encontra a todo momento e ainda tive a oportunidade de ter convivido com o seu grupo, que é formado por pessoas especiais, sempre prontas para contribuir comigo e no desenvolvimento da minha pesquisa na Microbiologia.

Quero agradecer também ao Prof. Titular Marco Antonio Bottino, por todo apoio, atenção e carinho comigo. Sua experiência profissional é ímpar, tanto no meio acadêmico como na vida clínica, e está sempre pronto a dividir seus conhecimentos.

A Equipe da Pós-graduação em Odontologia Restauradora, onde fui acolhida com tanto carinho e onde adquiri experiência em pesquisa científica. Tenho muito orgulho em participar deste grupo.

A Laura Lepesqueur, uma parceira doce e determinante neste trabalho, que realizou comigo todos os experimentos microbiológicos. Passamos juntas todas os

desafios de uma pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos de microbiologia. Os frutos deste trabalho também são seus.

Aos demais amigos da Microbiologia: Clélia, Néia, Aline Sampaio. Obrigada por prontamente me ajudarem quando precisei, e pela convivência tão agradável durante este tempo.

Aos colegas da pós-graduação: Ana Beatriz, Guilherme Schimitt, Cristiane Inagati, Pamela, Leonardo Jiro, Jefferson, Manassés, Natália Gonçalves, Renata Samico. Aos que foram exemplos para minha caminhada: Nathália Ramos, João Tribst e Amanda Dal Piva, por toda ajuda, suporte e ensinamentos.

Thaís Paradella e Márcio Marques que são o pilar para o funcionamento do laboratório, estando sempre atentos às minhas necessidades. Obrigada por toda dedicação.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À Conexão Sistemas de Prótese, pela doação dos implantes e componentes utilizados neste trabalho.

Os planos de Deus são maiores e melhores que os seus.

Ele vê infinitamente.

Nós somente vemos o que está diante dos nossos olhos.

Creia, os sonhos de Deus são maiores que os seus.

E jamais serão frustrados

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Evolução dos implantes osseointegrados.....	16
2.2 A interface entre o implante e as conexões protéticas.....	17
2.3 Infiltração bacteriana.....	19
2.4 CAD/CAM nas conexões protéticas.....	23
2.5 Ação da Prata.....	24
2.6 Clorexidina.....	27
3 PROPOSIÇÃO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Concentração inibitória mínima CIM.....	30
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	30
4.3 Avaliação da citotoxicidade da solução nanoprata coloidal sobre de células vero (ECACC 84113001) pelo teste MTT.....	33
4.4 Atividade antimicrobiana da nanoprata coloidal sobre a infiltração bacteriana por <i>Enterococcus faecalis</i> na interface implante pilar protético.....	35
4.5 Análise dos resultados.....	44
5 RESULTADO	45
5.1 Concentração inibitória mínima CIM.....	45
5.2 Atividade antimicrobiana da nanoprata coloidal sobre a infiltração bacteriana por <i>Enterococcus faecalis</i>	46
5.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).....	47
5.3.1 Avaliação da viabilidade de células Vero (ECACC 84113001) por teste MTT.....	50
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1- Cepa de Enterococcus faecalis ATCC 29212.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2 - Filtragem da Solução de Prata coloidal</i>	<i>31</i>
<i>Figura 3 – Procedimentos de diluição em placas de microtitulação para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução de prata coloidal.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 4 - Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução de prata coloidal</i>	<i>33</i>
<i>Figura 5 - Transferência do inóculo de Enterococcus faecalis para o interior dos implantes</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6 – Processo de inoculação do Enterococcus faecalis.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 7- Implante x Tratamento.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8 - Torque no pilar, de acordo com a recomendação do fabricante.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9- Conjunto Implante/Pilar com fio para amarrilho.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 10 – Procedimento de análise da contaminação externa imediata.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 11 - Procedimento para avaliação da contaminação secundária</i>	<i>40</i>
<i>Figura 12 – Procedimento de incubação dos tubos no ensaio de avaliação da contaminação secundária.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 13 – Reabertura do Implante.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 14- Solução salina (NaCl 0,9%) estéril no interior do Implante.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 15 - Cone de papel endodôntico estéril.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 16 - Ressuspensão das bactérias.....</i>	<i>43</i>

<i>Figura 17- Plaqueamento do conteúdo dos implantes em ágar pela técnica da gota.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18 - Subcultura em ágar brain heart infusion na concentração inibitória mínima da nanoprata coloidal.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 19 - Colônias de Enterococcus faecalis crescidas no ágar brain heart infusion após inoculação da suspensão resultante no implante na concentração de 29 ppm.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 20 - Colônias de Enterococcus faecalis crescidas no ágar brain heart infusion após inoculação da suspensão resultante no implante na concentração de 58 ppm</i>	<i>47</i>
<i>Figura 21 - Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) obtidos nos grupos em estudo.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 22 – Viabilidade celular observada nos testes de citotoxicidade das soluções de nanoprata 29 ppm e 58 ppm e solução de digluconato de clorexidina 2%, frente a célula Vero.....</i>	<i>51</i>

Pignataro RRDG. Atividade antimicrobiana de diferentes concentrações da prata coloidal aplicada em implantes do tipo hexágono externo: estudo *in vitro* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

Os implantes dentários osseointegrados apresentam altas taxas de sucesso no tratamento reabilitador a longo prazo. No entanto, complicações biológicas estão relacionadas com a ocorrência de peri-implantite, perda óssea marginal e insucessos clínicos. A busca de uma condição que diminua a colonização microbiana e estabelecimento de biofilmes tem crescido. O tratamento com nanop prata tem sido amplamente estudado como agente antimicrobiano por apresentar seu largo espectro de ação contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. O presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de nanopartículas de prata coloidal, sobre *Enterococcus faecalis* e a ocorrência de infiltração bacteriana na interface dos implantes de plataforma hexágono externo (HE) e pilares protéticos. Foi determinada a concentração inibitória mínima da solução de nanop prata coloidal. A citotoxicidade foi avaliada sobre células Vero (ECACC 84113001) pela técnica de MTT. A infiltração bacteriana na interface implante/pilar (TiBase®, Conexão Sistemas de Prótese), foi avaliada utilizando 40 conjuntos de implantes e pilares HE (n=10) divididos em 4 grupos de acordo com o tratamento: (1) prata coloidal 29 ppm; (2) prata coloidal 58 ppm; (3) controle negativo (sem tratamento) e (4) controle positivo (digluconato de clorexidina 2%). Inicialmente, da suspensão padronizada 1×10^6 células/mL de *Enterococcus faecalis* foi inoculada no interior dos implantes, e, a seguir, os respectivos pilares (TiBase®, Conexão Sistemas de Prótese) foram instalados com torque de 30N de acordo com o fabricante. Os conjuntos foram testados para contaminação externa imediata, suspensos em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), incubados por 24h a 37°C em estufa de CO₂. A turvação do caldo indicou infiltração bacteriana. A seguir, os corpos de prova foram incubados em aerobiose a 37°C, por 120 horas. Após incubação, os pilares foram desparafusados e o conteúdo interno dos implantes foi coletado com auxílio de cone de papel estéril e semeado em ágar para a determinação do número de células viáveis. Os dados de log₁₀ UFC/mL dos grupos foram comparados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para tanto, foi realizado um teste de normalidade, e, a seguir, foram aplicados os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn's post hoc com nível de significância de 5%. Resultados: Nenhum corpo de prova apresentou contaminação externa imediata. O número de células viáveis foi significativamente menor no grupo tratado com a nanop prata coloidal a 58 ppm em relação ao grupo controle negativo. O grupo tratado com digluconato de clorexidina a 2% obteve a contagem significativamente menor em relação aos demais grupos testados. A nanop prata coloidal 58 ppm foi severamente citotóxica. Conclui-se que a nanop prata coloidal na concentração de 58 ppm apresentou atividade antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis*, porém com elevada citotoxicidade para células eucarióticas.

Palavras-chave: Implantes dentários. Microinfiltração. Microrganismos. Nanopartícula prata. Peri-implantite.

Pignataro RRDG. *Antibacterial properties of a silver nanoparticles reduce internal contamination of external hexagon implants, in vitro study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.*

ABSTRACT

Osseointegrated dental implants have high success rates in long-term rehabilitative treatments. However, oral conditions could affect peri-implant tissues health and are associated to the occurrence of peri-implantitis, marginal bone loss and clinical failures. The search for a condition that can decrease the microbial colonization and the establishment of biofilms increased. Nanosilver has been widely used as an antimicrobial agent due large spectrum of action against Gram positive, Gram-negative bacteria and fungi. The present study aimed to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial action of colloidal silver nanoparticles on *Enterococcus faecalis* and on the infiltration at the interface between hexagonal external platform (EH) implants and prosthetic abutments. To obtain the optimal silver concentration, the minimum inhibitory concentration. Cytotoxicity evaluated on Vero cells (ECACC 84113001) by MTT assay. Bacterial infiltration through implant / abutment interface (TiBase®, Conexão Sistemas de Prótese) was evaluated using 40 sets of HE implants and abutments ($n = 10$) divided into 4 groups according to the treatment: (1) colloidal silver 29 ppm; (2) 58 ppm colloidal silver; (3) negative control (no treatment) and (4) positive control (2% chlorhexidine digluconate). Initially, under sterile conditions, 1 μL of a standardized 1×10^6 cels / mL suspension of *Enterococcus faecalis* was inoculated inside the implants, and the respective abutments (TiBase®, Conexão Sistemas de Prótese) were torqued to 30N according to the manufacturer's instructions. The systems were tested for immediate external contamination, suspended in test tubes containing 3 mL Brain Heart Infusion broth. The tubes were incubated for 24h at 37°C under a CO₂ atmosphere. Turbidity indicated external contamination. After the incubation period, the abutments unscrewed, and the internal content of the implants was collected with the aid of a sterile paper point. The bacterial cells were dispersed, and the suspension was plated to quantify the viable cells. Values of log₁₀CFU / mL obtained for the groups were statistically compared using the GraphPad Prism version 6.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A normality test was performed followed by Kruskal-Wallis and post hoc statistical tests with significance level of 5%. Results: No specimen showed immediate external contamination. Viable cells count was significantly lower in the 58-ppm colloidal nano-silver group when compared to the negative control group. The group treated with 2% chlorhexidine digluconate showed significantly lower counts when to the other groups tested. Colloidal nano silver 58 ppm was severely cytotoxic. It concluded that the 58-ppm colloidal nano silver presented antimicrobial activity on *Enterococcus faecalis* however with high cytotoxicity to eucariotic cells.

Keywords: Dental implants. Microleakage. Microorganisms. Silver nanoparticle. Peri-implantitis.

1 INTRODUÇÃO

O implante osseointegrado passou a ser uma alternativa de tratamento para pacientes edêntulos parciais ou totais, apresentando alta taxa de sucesso (Jung et al., 2008; Moraschini et al., 2015; Pjetursson et al., 2012). O sucesso clínico, bem como a longevidade do tratamento, é dependente de múltiplos fatores, tais como: a qualidade e a quantidade de osso no local do receptor (associado ao processo de estabilização imediata), planejamento preciso do tratamento, higiene bucal adequada (Bazrafshan, Darby, 2014; Heberer et al., 2011), além das propriedades de superfície dos implantes e componentes utilizados para a restauração, como biocompatibilidade e vantagens funcionais e mecânicas.

No entanto, a perda óssea marginal ao redor do pescoço do implante dentário, denominada de saucerização, é uma das complicações mais comuns após a instalação e tem uma grande influência no sucesso e estabilidade em longo prazo. A Osseointegração depende dos tecidos de suporte circundantes, que ancoram o implante, e também tem a função de fornecer uma vedação protetora (Dhir, 2013).

Com o auxílio de radiografias obtidas no ato da instalação, que servem tanto como referência inicial e para avaliar as alterações ósseas marginais que ocorrem no decorrer do tempo, tornou-se claro que a perda óssea inicial se dá logo após a instalação e após o implante ser colocado em função (Klinge, 2012).

As razões para tal perda óssea têm sido relacionadas, a algumas complicações, tais como remodelação do espaço biológico após a colocação do implante, trauma cirúrgico, perda de vascularização, reação à tensão, sobrecarga oclusal, influência do torque e destorque do pilar, ou uma resposta às bactérias contaminantes nos implantes, ou seja, infecções peri-implantares (Chrcanovic et al., 2014).

A peri-implantite não é uma complicação incomum, e existem muitas discussões a respeito do assunto (Albrektsson et al., 1994; Lindhe, Meyle, 2008; Albrektsson et al., 2012), em que alguns autores a identificam como um dos principais fatores para a perda óssea. Aproximadamente 70% dos implantes são perdidos, devido a reabsorção óssea, após a instalação do pilar e aplicação de carga protética, sugerindo que as falhas possam ocorrer principalmente após a

colocação desses implantes em função mastigatória (Chrcanovic et al., 2015; Moraschini et al., 2015; Macedo et al., 2016; Oh et al., 2002; Tatarakis et al., 2012).

Somente a partir do Workshop Mundial de 2017, ficou padronizado o diagnóstico de peri-implantite, que é caracterizada através de alguns sinais clínicos como inflamação, sangramento a sondagem e / ou supuração, profundidades de sonda aumentadas e / ou recessão da margem gengival, além da perda óssea radiográfica quando comparada com os exames anteriores. Nessa avaliação de perda óssea, devem ser considerar as alterações do nível da crista óssea, resultante da remodelação óssea inicial (Berglundh et al., 2018).

Segundo o Workshop de 2017, há um risco maior de desenvolver peri-implantite pacientes com histórico de periodontite, mau controle da placa bacteriana e nenhum cuidado de manutenção regular após a terapia com implantes. (Berglundh et al., 2018).

Embora as causas da perda óssea marginal ao redor do implante ainda não sejam bem elucidadas, é considerada uma condição fisiológica a perda óssea de 0,9 a 2,0 mm durante o primeiro ano após a ativação do implante, não excedendo 0,2 mm a cada ano subsequente em implantes de plataforma do tipo hexágono externo (Adell et al., 1981; Albrektsson et al., 1986; Brånemark et al., 1987; Cardaropoli et al., 2006; Sasada et al., 2017).

Os microrganismos podem colonizar a superfície externa do implante e se estabelecer na interface do implante/pilar da prótese, podendo causar odor e sabor desagradáveis, infecções e danos aos tecidos (Koutouzis et al., 2011).

A contaminação microbiana que ocorre durante a montagem implante-pilar é atribuída à micro desadaptação já existente, e a posterior micromovimentação, (Macedo et al., 2016), o que favorece a colonização por espécies microbianas presentes no biofilme bucal, levando a reações inflamatórias nos tecidos peri-implantares com consequente reabsorção do osso de sustentação (Adell et al., 1981; Garrana et al., 2016; Harder et al., 2010; do Nascimento et al., 2012, Nascimento et al., 2014; Retamal-Valdes et al., 2019; Steinebrunner et al., 2005). Segundo alguns autores, a infiltração bacteriana ocorre independentemente do sistema de conexão do implante, porém não há relatos da relação com a perda óssea nesses estudos (Passos et al., 2013; Podhorsky et al., 2016; Tallarico et al., 2017).

Como não há um padrão de desadaptação implante/pilar, clinicamente é aceitável $<120\ \mu\text{m}$ (Presotto et al., 2016; Yilmaz et al., 2018). Quanto melhor for a precisão do ajuste de uma prótese implanto-suportada, menor as chances de que ocorram complicações biológicas ou técnicas (Presotto et al., 2016; Al-Meraikhi et al., 2018; Yilmaz et al., 2018). Sabe-se que o desenho da interface implante-pilar e o modo de fabricação do pilar podem ter um impacto na quantidade de penetração microbiana na parte interna de um implante dentário. (Koutouzis et al., 2011; Al-Meraikhi et al., 2018).

A tecnologia CAD/CAM consegue fabricar pilares protéticos para vários sistemas de implantes dentários e tipos de conexão, que proporcionam ajuste e durabilidade previsíveis, permitindo que todos os parâmetros do pilar sejam modificáveis, como o término, perfil de emergência, contorno e espessura (Presotto et al., 2016; Al-Meraikhi et al., 2018).

Apesar de apresentarem menores níveis de desadaptação, os estudos relatam que não há diferença significativa nessas microfendas (Hamilton et al., 2013; Presotto et al., 2016; Al-Meraikhi et al., 2018).

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos, anaeróbio facultativo, encontrados no trato gastrointestinal e são relacionados com infecções endodônticas resistentes, podendo persistir no osso, mesmo após o tratamento endodôntico (Rams et al., 1992; Flanagan, 2017). Esses microrganismos têm características oportunistas (Komiyama et al., 2016), colonizando bolsas periodontais e contribuindo para a doença periodontal, podendo ainda contribuir para infecção peri-implantar e perda óssea (Rams et al., 1992; Sun et al., 2009; Ramos et al., 2012; Flanagan, 2017; Wang et al., 2019).

A prata é um metal amplamente estudado devido às suas propriedades antimicrobianas e seu amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. (Nandi et al., 2018). É biocida na forma iônica e tende a mostrar mais efeitos tóxicos para os microrganismos quando comparada com células e tecidos humanos (Cao, Liu; 2010; Nandi et al., 2018). O principal desafio para sua aplicação é a manutenção de uma concentração de prata segura para tecidos saudáveis em longo prazo. Ao longo dos anos, o uso da prata, direta ou indiretamente, por meio de várias tecnologias tem sido pesquisada, demonstrando

sua ação na prevenção da adesão bacteriana e suas propriedades antimicrobianas (Nandi et al., 2018).

Frente a tantos desafios ainda existentes na osseointegração e estabilidade dos implantes, a utilização de um agente antibacteriano como prata na sua forma coloidal, pode ser mais uma alternativa na busca para minimizarmos a porcentagem de falhas dos implantes devido à perda óssea marginal progressiva relacionada às infecções microbianas.

Os dados sobre a efetividade antimicrobiana *in vitro* da nanop prata coloidal sobre *Enterococcus faecalis* na interface implante e pilar protético podem auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de controle de microrganismos presentes no microbioma bucal passíveis de colonização dos tecidos peri-implantares e peças protéticas, podendo surgir futuramente como uma alternativa para a manutenção da saúde peri-implantar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evolução dos implantes osseointegrados

Desde a primeira metade do século 20, os dentistas buscaram alternativas para melhorar a fixação e a estabilidade da prótese em pacientes totalmente desdentados. Devido à negligência dos aspectos microbiológicos e aos riscos de infecção associados a essas intervenções, a maioria desses "implantes" foi perdida em um tempo relativamente curto, e a perda foi associada à infecção e à extensa perda de osso alveolar em regiões com um já volume ósseo mínimo (Albrektsson et al., 1986).

Somente quando os pesquisadores entenderam que apenas materiais de alta resistência à corrosão, tais como titânio e suas ligas, eram adequados para a integração do tecido, foi possível observar que as células ósseas cresciam diretamente sobre o titânio e integravam completamente o corpo estranho ao tecido ósseo (Hisbergues et al., 2009). Além disso, não era observada a proliferação do epitélio ou invasão da zona intermediária entre o osso e o implante (Steflik et al., 1998). Este fenômeno foi descoberto pela primeira vez por P.-I. Brånemark (Brånemark et al., 1969), e passou a ser denominado como fenômeno de osseointegração (Brånemark et al., 1977).

No final dos anos 1960, o segundo pioneiro, o Professor André Schroeder, da Universidade de Berna (Suíça), começou a examinar a integração tecidual de vários materiais de implantes, sendo que seu grupo foi o primeiro a documentar o contato direto entre implante de titânio, através de cortes histológicos, em modelos animais (Schroeder et al., 1976).

Na época, tentativas estavam sendo feitas para explorar a aplicabilidade dos resultados dessas pesquisas experimentais em prótese humana, e os autores já afirmavam que algumas características eram necessárias para os implantes, como a biocompatibilidade e apropriado desenho do implante, sua implantação através de uma técnica cirúrgica atraumática, uma precisa preparação do sítio receptor do implante e período de reparo livre de cargas (Albrektsson et al., 1981; Edgerton et

al., 1993).

Atualmente, por definição, sabe-se que a osseointegração é um desafio e que acontece no processo de cicatrização, sendo dividida em três estágios de estabilidade: primária, secundária e terciária (Bosshadt et al., 2017). A estabilidade primária ocorre após a colocação do implante e depende do desenho do implante, da densidade óssea e da técnica cirúrgica adotada, em que ocorre a incorporação por formação de tecido ósseo (Bosshadt et al. 2017; Javed et al., 2013;). Já a estabilidade secundária, resulta dos fenômenos de regeneração e remodelação óssea, que determinam a estabilidade do implante. Assim, um dos objetivos nesse estágio é melhorar as superfícies dos implantes para acelerar a osseointegração durante o período de cicatrização (Botzenhart et al., 2015). Além disso, os implantes não devem receber carga neste estágio para evitar o risco de falha precoce (Esposito et al., 2009). Durante a estabilidade terciária, que é a etapa final, a adaptação funcional do osso ao redor do implante sob carga (Hasan et al., 2014) é baseada na estabilidade primária e secundária e é, de fato responsável pelo sucesso do implante ao longo prazo.

2.2 A interface entre o implante e as conexões protéticas

Na década de 1960, Brånemark realizou os primeiros estudos pré-clínicos e clínicos do primeiro implante dentário projetado por ele e consistia em uma conexão hexagonal externa, em que o pilar era conectado mecanicamente ao implante por meio de um parafuso (Brånemark et al., 1977). Já em 1981, Adell e Brånemark, relataram o resultado de 15 anos de testes clínicos, em que utilizaram implantes de titânio, principalmente em mandíbulas desdentadas para apoiar próteses dentárias fixas com o objetivo de melhorar o conforto da mastigação e a qualidade de vida desses pacientes, obtendo resultados muito promissores (Adell et al., 1981).

Em 1986, uma das primeiras conexões internas implante-pilar foi desenvolvida por Niznick (Niznick, 1991). Esta conexão foi projetada com uma conexão hexagonal interna de 1,7 mm de profundidade abaixo de um cone de 45 graus de 0,5 mm de largura que provou ter propriedades superiores na distribuição

de força quando comparada à conexão original do implante-pilar hexagonal (Muley et al., 2012). Desde então, diversas variações da conexão implante-pilar interna e externa foram desenvolvidas na tentativa de melhorar os projetos anteriores.

Esse sempre foi um desafio para todos os sistemas de implantes, a eficiência da conexão implante-pilar, que depende de vários fatores, como o desenho do componente, geometria da conexão, ajuste mecânico e físico entre o pilar e a plataforma do implante e aplicação de torque, em que esse conjunto de fatores são fundamentais para a saúde dos tecidos circundantes. (Carotenuto et al., 1999).

Além da complexidade dos componentes protéticos e à ausência de um ligamento periodontal ao redor do implante, o conjunto implante/pilar é incapaz de se adaptar prontamente às tensões geradas pela mastigação, resultando na formação de uma microfenda nessa região de união, que funciona como um nicho para as bactérias, causando, muitas vezes, reações inflamatórias nos tecidos moles peri-implantares, pela colonização bacteriana, inclusive, no interior do implante (Jansen et al., 1997; Koutouzis et al., 2011; do Nascimento et al., 2008; Quirynen et al., 1994; Sasada et al., 2017; Talebi Ardakani et al., 2019).

As bactérias que estão colonizando a superfície externa podem ser eliminadas pelo mecanismo de defesa do organismo; no entanto, a existência da microfenda permite micromovimentos entre o pilar e o implante, que resultam em um efeito de bomba, que favorece a contaminação do interior do implante, que podem persistir por longos períodos. Clinicamente, provocam mau odor, gosto desagradável na cavidade bucal, infecções e danos teciduais ao periodonto, sendo responsáveis pela reabsorção óssea inicial (Jansen et al., 1997; Listgarten, 1999). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a presença de bactérias viáveis na parte interna dos implantes, demonstrando infiltração de fluidos e bactérias em todo seu espaço interno, podendo ser uma fonte de contaminação para os tecidos próximos ao implante instalado (Koutouzis et al., 2016; Sasada et al., 2017; Talebi Ardakani et al., 2019).

Segundo diversos autores (Al-Meraikhi et al., 2018; Tsuge et al., 2008; Yilmaz et al., 2018), Brånemark foi o primeiro a avaliar a desadaptação entre implantes/pilar e propôs que não deveria ultrapassar 10 μm , tanto em modelos de hexágono externo como interno. Para Tsuge et al. (2008) seus resultados

apresentaram discrepâncias verticais médias que variaram de 22,6 a 62,2 μm ; as discrepâncias horizontais foram de 27,1 a 16,0 μm . Cada sistema de implante apresentou um ajuste marginal de acordo com sua geometria característica. E os valores das microfendas de todas as interfaces implante-pilar analisadas neste estudo variaram de 2,3 a 5,6 μm , coincidindo com os resultados encontrados por Solá-Ruíz et al. (2013).

Atualmente, os valores médios de discrepância marginal para todos os grupos estejam dentro dos limites clinicamente aceitáveis é de $<150 \mu\text{m}$ (Al-Meraikhi et al., 2018; Pesce et al., 2018; Presotto et al., 2016; Yilmaz et al., 2018).

Além das necessidades de aprimoramento nos implantes, durante a década de 1990, modificações cirúrgicas foram implementadas para melhorar a previsibilidade da técnica de regeneração óssea guiada e para reduzir o risco de complicações. Isso incluiu técnicas de incisão melhoradas, utilização de dispositivos de fixação para estabilizar as membranas e aplicação de enxertos ósseos para apoiar as membranas (Buser et al., 1993), e, mais tarde, a utilização de barreira reabsorvível tornou-se cada vez mais popular.

2.3 Infiltração bacteriana

Desde Koka et al. (1993) e corroborado por Lang et al. (2011), sabe-se que existem vários fatores que interferem no sucesso do tratamento, como, por exemplo, a microbiota bucal. Independentemente da existência de implantes, não há dúvidas da relação de causa e efeito do biofilme dentário com os dentes naturais, a gengivite ou a doença periodontal. As bactérias específicas da doença periodontal foram relacionadas aos implantes dentários osseointegrados, sendo um fator que precisa ser amplamente estudado, na tentativa de minimizar a ação deletéria do biofilme dentário sobre a estabilidade e sucesso do implante (Dhir, 2013; Eggert, Levin, 2018; Koka et al., 1993; Lorenz et al., 2019; Penarrocha-Oltra et al., 2016).

Após o primeiro contato do implante com a cavidade bucal, proteínas e glicoproteínas salivares se ligam no implante formando um filme fino, a chamada película adquirida (Busscher et al., 1997; Dhir, 2013; Quirynen et al., 1994). Estas

moléculas atuam, principalmente, promovendo a adesão e agregação de microrganismos. O aumento da rugosidade superficial e da energia livre da superfície facilita ainda mais a formação de biofilme nas superfícies dos implantes e dos pilares (Dhir, 2013; Subramani et al., 2009). Inicia-se então a fase de acumulação, os microrganismos se multiplicam formando vários grupos de células em camadas na superfície do implante. Ocorre a liberação de substâncias poliméricas extracelulares, basicamente polissacarídeos, formando um conjunto de multicamadas de colônias microbianas que se mantém suspensas na matriz polimérica (Subramani et al., 2009), denominada de biofilme (Dhir, 2013).

Em 2005, Scarano et al. relataram um acompanhamento de 16 anos em 272 implantes de titânio, cujos resultados obtidos esclareceram as dimensões das microfendas in vivo. Os autores concluíram que as microfendas foram encontradas em todos os implantes presentes na prática clínica e que é muito difícil reduzir as dimensões desses espaços vazios, o que certamente facilita a migração bacteriana e a presença de bactérias no interior do implante.

Na maioria dos estudos, segundo Pereira et al. (2017), a discrepância marginal, implante-pilar considerada clinicamente usual é de cerca de 100 μm , antes de ser colocado em função. Essa microfenda pode aumentar após o início do esforço mastigatório. No entanto, a maioria das bactérias orais tem tamanho de 0,2 a 1,5 μm e comprimento de 2 a 10 μm (Nascimento et al., 2016). As bactérias e endotoxinas podem passar livremente através da microfenda e entrar na cavidade interna do implante, o que resulta na troca de biomateriais entre a cavidade interna do implante e o ambiente bucal peri-implantar (Teixeira et al., 2011).

A passagem de bactérias, subprodutos tóxicos bacterianos e pequenas moléculas através da microfenda na interface implante/pilar e a penetração na cavidade interna do implante ou vice-versa é definida como a microinfiltração implante/pilar (Ericsson et al., 1995; Gross et al., 1999; Quirynen, van Steenberghe, 1993; Quirynen et al., 1994;). Esta contaminação, segundo os autores, pode ocorrer durante o primeiro ou o segundo estágio de colocação do implante ou mesmo na transmissão do ambiente após a colocação da prótese (Scarano et al., 2005). Logo, a microfenda, com dimensões imprevisíveis e variáveis, pode ser um fator crítico para a migração de bactérias para a porção interna do implante e na reabsorção óssea (Quirynen et al., 1994; Scarano et al., 2005; Tsuruta et al., 2018).

Estes resultados confirmam que a interface existente entre o implante-pilar atua como um reservatório para microrganismos bucais que, por sua vez, induzem resposta inflamatória dentro dos tecidos peri-implantares, resultando em perda de osso peri-implantar (Koutouzis et al., 2011; Nascimento et al., 2015; Sasada et al., 2017; Wang et al., 2019). Como isso, estudos foram realizados sobre a influência da presença de bactérias viáveis sobre a estabilidade das conexões implante-pilar. Em 2010, Harder et al. sugeriram que a presença de endotoxinas bacterianas foi suficiente para iniciar a reação inflamatória e a destruição tecidual que leva à perda óssea peri-implantar. Esse fenômeno também foi relatado por Hou et al. (2013), descrevendo a regulação de osteoclastos por endotoxinas bacterianas. No estudo de Harder et al. (2010) sobre duas conexões internas implante-pilar, foi demonstrada infiltração bacteriana 5 minutos após a instalação do implante. Fürst et al. (2007) relatou a ocorrência de contaminação 30 minutos após o procedimento cirúrgico. Os estudos sugerem uma variação no desempenho do selamento na conexão implante-pilar dependendo do sistema utilizado (Fürst et al., 2007; Harder et al., 2010; Hou et al., 2013).

Segundo Lang et al. (2011), o desenvolvimento de lesões de peri-implantite tem muitas características em comum (por exemplo, tamanho e composição) com a periodontite. A perda óssea durante a progressão da doença é mediada por reações inflamatórias e resultam em reabsorção osteoclástica em ambas as doenças, sendo mais rápida na peri-implantite devido às diferenças estruturais. O periodonto produz uma reação autolimitante, resultando em uma cápsula protetora de tecido conjuntivo que separa a lesão do osso alveolar, situação essa que ocorre na periodontite, mas não é observada na peri-implantite. As lesões peri-implantares, em contraste com as lesões de periodontite, exibem sinais de inflamação aguda e grandes quantidades de osteoclastos presentes na superfície do osso crestal (Lang et al., 2011).

A manutenção do tecido ósseo peri-implantar é essencial para o sucesso a longo prazo dos implantes dentários. Os resultados desse tipo de tratamento estão relacionados ao implante, ao tecido mole peri-implantar e à prótese, além da avaliação das condições gerais do paciente (Papaspolidakis et al., 2012). O tecido ósseo peri-implantar está relacionado à estabilidade do tecido, que influencia a progressão da perda óssea marginal em torno de implantes saudáveis. A perda de 2 mm de osso ao redor do pescoço do implante durante o primeiro ano após o

carregamento funcional tem sido considerada normal (Albrektsson et al., 1986; Misch et al., 2008). Klinge (2012) descreveu que uma perda óssea marginal > 2 mm na instalação da prótese em comparação com as radiografias iniciais, associada com sangramento à sondagem, serve de alerta para o clínico avaliar a necessidade de uma intervenção para alcançar a saúde peri-implantar (Klinge, 2012). Já outros autores afirmaram que uma perda óssea marginal no primeiro ano de 1,5 mm (Papaspriidakos et al., 2012), 1,8 mm (Roos-Jansåker et al., 2006) ou 1,5 - 2 mm (Tarnow et al., 2000) representa um bom resultado.

Tripodi et al. (2012), realizaram um estudo *in vitro* avaliando a infiltração de diferentes microrganismos na conexão entre o implante e o pilar protético de dois tipos diferentes de implantes: hexágono-interno (HI) e cone Morse (CM), durante 28 dias. Foram utilizadas duas espécies bacterianas, as partes internas de 5 implantes, por grupo, foram inoculados com suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* e 5 implantes, por grupo, com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA). Os resultados mostraram que em todos os casos houve contaminação interna das amostras de HI pelos microrganismos durante todo o intervalo de tempo avaliado. Por outro lado, no implante do tipo CM não foi observada contaminação por *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das amostras em nenhum período de tempo avaliado, sendo apenas dois implantes contaminados por *P. aeruginosa* em um total de 10 amostras no 22º dia (Tripodi et al., 2012). Assim, pôde-se concluir que a contaminação bacteriana ocorreu nas duas conexões pilar/implante avaliadas, entretanto, variou de acordo com a espécie microbiana.

Segundo Galindo-Moreno et al. (2015), embora a perda óssea marginal seja desencadeada por múltiplos fatores, incluindo o tipo de conexão, tipo de osso, sexo, idade e periodontite, ele observou que o resultado aos 18 meses depende fortemente do tipo de perda óssea, que parece ser diferente para cada implante. Também concluíram que a perda óssea marginal é diretamente dependente das características de cada implante e do paciente. Em outras palavras, a definição de sucesso ou fracasso em implantodontia requer uma avaliação das características do implante / paciente, com cada um desempenhando um papel importante no prognóstico. Um paciente com múltiplos implantes do mesmo tipo pode apresentar aumento de perda óssea marginal em poucos implantes, mas não no restante; assim, 17,5% dos pacientes apresentaram alguma perda óssea marginal em 78,5%

dos implantes, mas não nos restantes (Galindo-Moreno et al., 2015).

Hoje, com mais de 40 anos de evidências científicas, o uso clínico de implantes tem aumentado a cada dia. O Hexágono externo foi o primeiro desenho empregado e continuou sendo o único por muitos anos; no entanto, apresenta várias complicações mecânicas e biológicas, como afrouxamento do parafuso, desajuste rotacional na interface implante-pilar, o que permite a existência de microfendas na interface implante-pilar e a penetração microbiana (Muley et al., 2012; Pjetursson et al., 2005). Além disso, este sistema é menos favorável para a distribuição de tensão e possui menor estabilidade quando comparado com a conexão interna, o que aumenta a tensão sobre o parafuso do pilar e micromovimentos durante o carregamento (Freitas-Júnior et al., 2013; Machado et al., 2013).

Diversos estudos (Mishra et al., 2017; Talebi et al., 2019) concluíram que ocorre infiltração na interface do implante/pilar e que os implantes de hexágono externo falharam completamente por não evitarem a microinfiltração em condições de carga estática e dinâmica dos implantes. Os implantes de hexágono interno, principalmente os Cone Morse, são muito promissores em caso de carregamento estático e também apresentaram menor microinfiltração em condições de carga dinâmica. O torque recomendado pelo fabricante deve ser seguido estritamente para obter uma vedação melhor na interface do implante do pilar. Já os pilares de zircônia são mais vulneráveis à microinfiltração do que os pilares de titânio e seu uso deve ser desencorajado. Os pilares de zircônia devem ser restritos apenas aos casos em que há alta necessidade estética (Mishra et al., 2017; Talebi et al., 2019). (verificar se o implante também é de Zircônia)

2.4 CAD/CAM nas conexões protéticas

A tecnologia CAD/CAM (Computer Aided Design / Computer Aided Manufacturing) foi introduzida na odontologia em busca de uma melhor adaptação e assentamento passivo na interface implante/pilar (Brånemark, 1983; Goodacre et al., 2012; Muley et al., 2012).

Os principais objetivos de automatizar e aperfeiçoar a produção (Miyazaki et

al., 2009), que é composta por três principais componentes: ferramenta de digitalização (scanner), software para planejamento virtual e unidade de produção (fresadora), sendo o scanner um dos principais responsáveis pela precisão das peças confeccionadas, podendo ser dividido de acordo com seu mecanismo de funcionamento entre: ópticos (fundamentados no princípio de triangulação da luz) e mecânicos (modelo mestre lido mecanicamente por uma bola de rubi e uma estrutura de medição tridimensional) (Beuer et al., 2008).

A tecnologia CAD/CAM tem evoluído muito nas últimas décadas, na tentativa de aprimoramento passivo dos materiais e técnicas disponíveis. Presente na odontologia desde meados dos anos de 1980, revolucionou, de maneira significativa, todo o mercado odontológico e a qualidade do tratamento reabilitador que passou a ser oferecido aos pacientes (Abduo et al, 2014; Mizumoto et al., 2018).

Na busca de reduzir a dependência da variável humana nas falhas protéticas, ainda não foi totalmente alcançado, uma vez que a digitalização intraoral é um passo crucial na odontologia, inclusive nos implantes (Örtorp et al, 2012). A transferência imprecisa da posição do implante pode levar a uma prótese mal ajustada, que pode resultar em complicações biológicas e mecânica. Reduzir a etapas realizadas pelo profissional e implementar técnicas automatizadas de desenho e fabricação facilitaria produção de próteses mais confiáveis (Abduo et al., 2014).

Entretanto, observa-se que os sistemas CAD-CAM são suficientes para resolver as mais diversas situações clínicas; e por este motivo é nítido um crescente número de estudos que vem sendo realizados para verificar a precisão dos sistemas CAD-CAM, mesmo estes já estando em uso (Ative et al., 2017; Benic et al., 2015).

2.5 Ação da Prata

A crescente resistência dos microrganismos aos antibióticos é uma questão de grande preocupação em todo o mundo (Hemeg et al., 2017; Wang et al., 2017). Portanto, a busca por novas estratégias para a inibição bacteriana está em progresso contínuo. Considerando que não há relatos de desenvolvimento de

resistência microbiana à prata, o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) tem sido amplamente estudado (Hemeg et al., 2017; Wang et al., 2017).

Há muito tempo a ação bactericida de alguns íons metálicos é conhecida, dentre eles a prata e o cobre. O efeito bactericida relaciona-se com a ação oligodinâmica (substâncias que, em concentrações extremamente baixas, afetam a atividade de organismos vivos) do íon prata e compostos à base de prata, que são altamente tóxicos para microrganismos, mostrando fortes efeitos biocidas, e sobre diversas espécies de bacterianas, incluindo *Escherichia coli*. (Zhao et al., 1998).

Desde então, muitos avanços tecnológicos ocorreram nessa área. É importante salientar que estes produtos atuam por meio da ionização dos elementos metálicos bactericidas, evitando que metais puros sejam liberados ao meio ambiente de maneira que não prejudiquem o ser humano. Historicamente, a prata foi amplamente utilizada em várias áreas da medicina. Em 1700, o nitrato de prata foi utilizado para o tratamento de infecções sexualmente transmissíveis, fístulas ósseas e das glândulas salivares e abscessos perianais (Klasen, 2000; Lansdown, 2002).

Após a introdução da penicilina, na década de 1940, os antibióticos passaram a ser adotados como protocolo de tratamento para infecções bacterianas, e o uso da prata diminuiu (Chopra, 2007). Há pouco mais de 15 anos, devido ao aparecimento de bactérias resistentes (Gould et al., 2009) e limitações ao uso de antibióticos, os médicos têm recorrido à prata de uso tópico, utilizando-a em curativos de feridas abertas, contendo diferentes concentrações de prata (Chopra, 2007).

A propriedade antimicrobiana da prata está relacionada à quantidade e à taxa de prata liberadas. A prata em seu estado metálico é inerte, mas reage com a umidade da pele e do fluido da ferida, ficando ionizada e altamente reativa, uma vez que se liga a proteínas dos tecidos e traz mudanças estruturais na parede da célula bacteriana e membrana nuclear, provocando distorção celular e morte, além da prata se ligar ao DNA e RNA bacteriano por desnaturação e inibir a replicação bacteriana (Lansdown, 2002; Lara et al., 2015). Os íons de prata interagem com grupo tióis em proteínas, resultando em inativação de enzimas respiratórias e levando à produção de espécies reativas de oxigênio (Matsubara et al., 2015).

Segundo Xu et al. (2004), o transporte através das membranas desempenha um papel importante nas vias celulares e subcelulares, incluindo resistência a

múltiplos fármacos, sinalização celular e comunicação célula-célula. Este estudo avaliou diretamente a mudança em tempo real da permeabilidade da membrana e tamanhos de poros de *P. aeruginosa* em escala nanométrica usando o índice de cores intrínsecas (espectros de ressonância plasmônica de superfície) de nanopartículas de prata como sondas de índice de tamanho nanométrico. Os resultados mostraram que nanopartículas de prata com tamanhos variando de até 80 nm são acumuladas em células microbianas vivas, demonstrando que essas nanopartículas de prata se transportam através das membranas interna e externa das células. Medições de suscetibilidade também sugerem que uma baixa concentração de nanopartículas de prata (1,3 ppm) não apresentou toxicidade significativa para as células humanas (Xu et al., 2004).

Ainda em 2006, Harris et al. (2006), relataram que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* têm capacidade de aderir à superfície do implante, formando um biofilme difícil de ser tratado, causando infecções. Esse biofilme protege as bactérias da fagocitose e antibióticos (Harris et al., 2006; Kang et al., 2019).

Em 2015, o estudo de Matsubara et al. concluiu que a prata coloidal na concentração de 320 ppm foi eficaz na redução do número de células viáveis de *C. albicans* dentro dos implantes com conexão hexagonal externa. Porém, também concluíram que os valores de torque sugeridos pelo fabricante são importantes para alcançar o melhor efeito de acoplamento em relação à geometria do sistema. No entanto, as cargas mastigatórias nas coroas protéticas criam microfendas na interface implante / pilar que permitem a penetração de bactérias e leveduras nos implantes. Neste estudo, a aplicação de nanoprata no interior dos implantes reduziu a quantidade de células fúngicas viáveis detectáveis na superfície interna dos implantes (Matsubara et al., 2015).

Já Akter et al. (2017), concluíram em sua pesquisa que até o momento os estudos não são suficientes para se ter uma ideia concreta acerca da citotoxicidade da nanoprata e também do mecanismo por trás da toxicidade. Mas, com base nos resultados, é evidente que a citotoxicidade da nanopartícula de prata pode ser considerada como dependente de diferentes tipos de propriedades, tais como tamanho (partícula menor é responsável pela alta toxicidade), forma, concentração, aglomeração ou agregação das nanopartículas. Além disso, a nanoprata também

pode induzir citotoxicidade através do estresse oxidativo, que inicia uma protease pró-inflamatória, a ativação da caspase-1 que regula a apoptose ou a morte celular. Logo, para uma melhor compreensão do mecanismo de citotoxicidade da nanop prata, mais estudos são necessários (Akter et al., 2017).

Em 2019, um estudo concluiu que a nanopartícula de prata (AgNPs) pode ser um agente de tratamento contra bactérias extracelulares, em particular as que apresentam o diâmetro de 40 nm. As AgNPs exibiram excelente atividade antimicrobiana contra *S. aureus* extracelular com inibição completa do crescimento bacteriano em concentrações tão baixas quanto 56 µm (Kang et al., 2019).

2.6 Clorexidina

Clorexidina é um agente ativo de superfície com efeito antimicrobiano e antifúngico (Sheen, 2003). É indicada para assepsia de amplo espectro sendo frequentemente prescrita no tratamento das doenças periodontais (Koutouzis et al., 2015). Em 2008, Paolantonio et al. realizaram um estudo onde os parâmetros clínicos e microbiológicos foram registrados três meses após a conclusão da restauração protética. A cavidade interna do implante foi preenchida com gel de clorexidina a 1% e, em seguida, o implante foi conectado ao pilar. Após seis meses, os parâmetros clínicos e microbiológicos foram reexaminados. O grupo tratado com clorexidina preveniu eficazmente a colonização bacteriana e causou melhorias significativas nos parâmetros clínicos, em contraste com o grupo controle (Paolantonio et al., 2008). Da mesma forma, Groenendijk et al. (2004) relataram que 0,2% da solução de clorexidina inibiu o crescimento bacteriano, e o efeito benéfico poderia durar seis semanas (Groenendijk et al., 2004). Por outro lado, alguns estudos relataram que apenas a irrigação por solução de clorexidina não exerceu efeito significativo sobre a penetração bacteriana na interface implante/pilar (Carcuac et al., 2016; Romanos et al., 2016).

Koutouzis et al. (2015) trataram a cavidade interna do implante com solução de clorexidina a 0,2% e com solução salina estéril. Posteriormente, os pilares foram substituídos e os implantes foram ciclados. Endotoxinas foram detectadas em

ambos os grupos, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos testes mecânicos (Koutouzis et al., 2015).

As diferenças nos resultados podem ocorrer, devido ao diferente tempo de exposição à clorexidina quando localizado na cavidade interna do implante e na área subgengival. Logo, o benefício da clorexidina é difícil de justificar à luz das evidências opostas. Portanto, sugere-se o uso de clorexidina no implante oral com possíveis benefícios, e a dosagem e a forma adequadas da clorexidina, que poderiam tornar seu efeito bactericida mais duradouro, ainda precisam de mais estudos (Ready et al., 2015).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Determinar a atividade antimicrobiana e a concentração inibitória mínima da nanoprata coloidal;
- Determinar a citotoxicidade da nanoprata coloidal em concentração antimicrobiana efetiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solução de prata coloidal

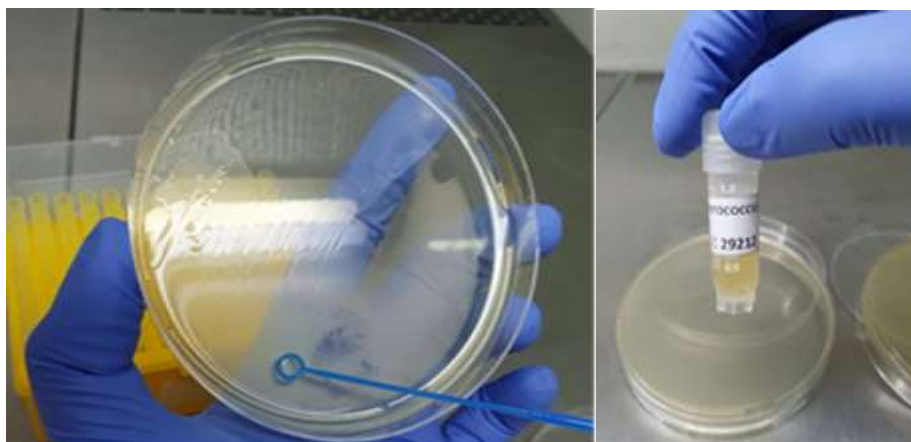
A fórmula da solução de AgNPs Khemia® utilizada no trabalho é $\text{Ag}_2\text{CO}_3/\text{AgHCO}_3$, e as partículas foram obtidas e caracterizadas anteriormente (Sousa, 2018).

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foi realizado teste para a determinação da concentração inibitória mínima da solução de prata coloidal (CIM), sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Os testes foram realizados de acordo com as normas do CLSI M7 A9 (Métodos para Diluição de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana para Bactérias de Crescimento Aeróbico). A determinação da CIM foi efetuada por diluições sequenciais microplacas da nanop prata em caldo de Müller Hinton (MH). Considerou-se a MIC, a diluição que levou à inibição completa do crescimento do microrganismo em relação ao controle de crescimento.

Para a realização dos testes a solução de prata coloidal foi esterilizada por filtração (filtro 0,22 μm) (Figura 2) e submetida ao teste de esterilidade pelo método de semeadura em ágar. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi semeado ágar BHI (brain heart infusion) (Figura 1) e incubados a 37°C, em aerobiose. Após este período, suspensões padronizadas contendo 1×10^8 células/mL foram obtidas por diluição em meio Müller Hinton estéril e padronizadas por espectrofotometria. O valor de absorvância foi previamente padronizado em espectrofotômetro digital (Modelo B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a um comprimento de onda de 760 nm e absorvância óptica de $0,220 \pm 0,02$.

Figura 1 – Cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



Legenda: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi semeado em ágar BHI (brain heart infusion).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 - Filtragem da Solução de Nanoprata Coloidal



Legenda: A solução de nanoprata coloidal foi esterilizada por filtração (filtro 0,22 μm).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico, no interior de uma câmara de fluxo laminar (BioSeg 12, Veco, Campinas, Brasil). Os procedimentos foram realizados sem iluminação interna na cabine, pois a nanoprata coloidal é fotossensível. A concentração inicial foi de 58 ppm em caldo Müller Hinton em placas de microtitulação.

A suspensão de *E. faecalis* foi ajustada a $1\sim 5 \times 10^5$ cel/mL para realização do teste de determinação da CIM (Figura 3). As placas de microtitulação foram envoltas em papel alumínio incubadas, em aerobiose, a 37°C (Figura 4). As leituras foram realizadas após 5 minutos, 30 minutos e 24 horas de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 3 – Procedimentos de diluição em placas de microtitulação para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução de nanop prata coloidal



Legenda: A suspensão de *E. faecalis* foi ajustada a $1\sim 5 \times 10^5$ cel/mL para realização do teste de determinação da CIM, em triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Ensaio para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução de nanop prata coloidal



Legenda: As placas de microtitulação foram envoltas em papel alumínio para proteção contra luz e incubadas em aerobiose a 37°C.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Avaliação da citotoxicidade da solução nanop prata coloidal sobre de células vero (ECACC 84113001) pelo teste MTT

A avaliação da citotoxicidade da solução de prata coloidal foi realizada pelo ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (ISO10993:1999).

Células Vero (ECACC 84113001) foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino 100 IU mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina a 37°C e 5% de CO₂. As culturas primárias das células Vero foram estabilizadas para crescimento e expansão celular. Para manutenção da cultura celular, o meio de cultura foi substituído a cada 48 h e, as células cultivadas durante 15 dias. Para a verificação das células viáveis para o teste, foi utilizado o teste azul de Trypan (0,4%) que consistiu em aplicar 30 µl do corante em 30 µl de solução de células em um tubo cônico de 2 mL. Em seguida, 10 µl da mistura foi aplicada sobre uma placa de Neubauer para quantificação celular.

Após comprovação de quantidade celular suficiente para realizar o experimento, as garrafas foram lavadas com solução tampão fosfato-salino – PBS (Cultilab Ltda., Campinas) e, para desprender as células das garrafas, 2 mL de tripsina 0,05% (Gibco) foram adicionados à solução e, em seguida, as células foram armazenadas durante 5 min em estufa (5% de CO₂, 37°C). Após esse período, a ação da tripsina foi neutralizada, agregando 4 mL de meio de cultura.

Em seguida, as células foram semeadas (1x10⁶ células) em placas de 96 poços 24 h antes da aplicação do tratamento. As placas foram incubadas a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, as células foram submetidas ao tratamento com a solução de nanop prata coloidal 58 ppm; 29 ppm e Clorexidina à 2%, por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado meio DMEM. As aplicações foram feitas em triplicata e reproduzidas por 2 vezes.

A sobrevivência celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH), que é indicativa da função mitocondrial, que é observada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio; Sigma, St Louis, USA). A viabilidade celular foi quantificada pela dissolução do MTT em HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution), e a viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (=100%). Após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi descartado. As monocamadas celulares no fundo dos poços foram lavadas com 100 µL de PBS. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100 µL da solução de MTT, que foi preparada conforme recomendação do fabricante (0,5 mg/mL de PBS). As placas foram incubadas durante 24 h a 37°C em ambiente sem luz. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e os poços foram lavados com 1000 µL de PBS. Foi acrescentado 50 µL de DMSO, incluindo nos poços controles e as placas foram incubadas por 10 min. sob agitação em mesa orbital por 10 min. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro. A leitura resultante foi mensurada através de um comprimento de onda de 570 nm (EL808IU, Biotek, Vermont, EUA).

Os percentuais de viabilidade celular foram classificados como não citotóxico (>90% de viabilidade celular), levemente citotóxico (60-90% de viabilidade celular) moderadamente citotóxico (59-30% de viabilidade celular) e severamente citotóxico

(29-0% de viabilidade celular), sendo o controle negativo considerado como 100 % de viabilidade celular (Sletten, Dahl, 1999).

4.4 Atividade antimicrobiana da nanoprata coloidal sobre a infiltração bacteriana por *Enterococcus faecalis* na interface implante pilar protético

Neste estudo, 40 conjuntos formados por implantes HE de 4,0 x 15 mm, pilares digitais protéticos Precision CAD/CAM®, e parafusos hexagonais de titânio (Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil) foram divididos em quatro grupos conforme os tratamentos adotados.

Grupo 1 (n=10): Solução de Nanoprata Coloidal 29 ppm.

Grupo 2 (n=10): Solução de Nanoprata Coloidal 58 ppm.

Grupo 3 (n=10): Controle Negativo (Sem tratamento).

Grupo 4 (n=10): Controle Positivo (Solução de digluconato de clorexidina a 2%).

A técnica utilizada neste estudo para a verificação da infiltração bacteriana foi a indireta (ou reversa), a inoculação de bactérias foi realizada no interior do implante e houve posterior observação de sua passagem para o meio externo, assumindo-se que o fluxo bacteriano pode ocorrer nesta direção da mesma forma que na direção oposta (Traversy, 1992).

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico. Todo o instrumental, as soluções e os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave, e toda a manipulação foi realizada com luvas estéreis. Implantes e pilares (TiBase®) foram fornecidos estéreis pelo fabricante.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 foi semeado ágar BHI e incubados a 37°C, em aerobiose, por 24 h.

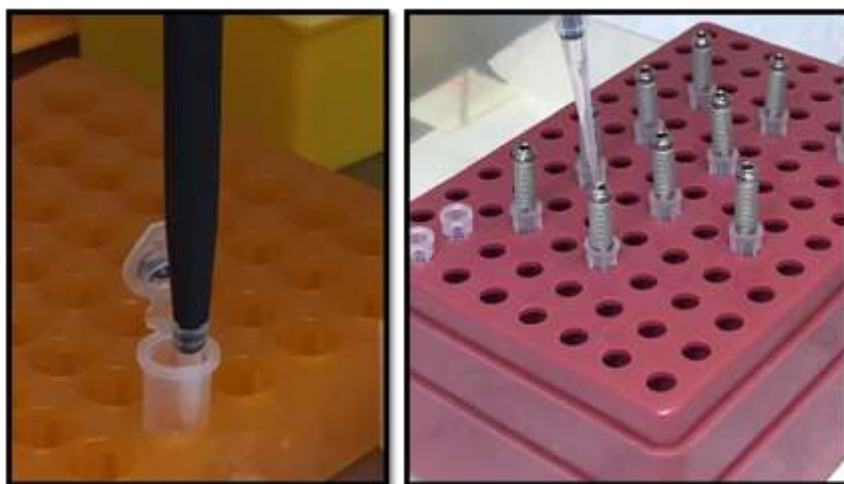
Após este período, suspensões padronizadas contendo 1×10^6 células por mililitro foram obtidas por diluição em caldo BHI estéril e padronizadas por espectrofotometria. A absorbância foi previamente padronizada em

espectrofotômetro digital (Modelo B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 760 nm e OD= 0,060 + 0,02.

A quantidade inoculada, no interior do implante, foi determinada em estudo piloto previamente realizado, colocando 1 μ l do inóculo (Figura 5). Em todos os grupos, foi promovida a pré-adesão do biofilme, colocando-os na estufa a 37°C sob agitação de 80 rpm, por 1 hora e meia (Figura 6) (Cazalini et al., 2017).

Posteriormente, os implantes foram tratados com 1 μ l da solução de tratamento, de acordo com os grupos citados. Após o tratamento, o pilar protético foi instalado com torque de 30Ncm, de acordo com a recomendação do fabricante (Figura 7).

Figura 5 - Transferência do inóculo de *Enterococcus faecalis* para o interior dos implantes



Legenda: Inoculação de 1 μ l de suspensão de *E. faecalis* no interior do implante.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 – Processo de inoculação de *Enterococcus faecalis*



Legenda: Pré-aderência inicial do biofilme, em estufa com agitação (37°C – 80 rpm).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7- Implante x Tratamento



Legenda: Tratamento do implante com 1 μ L solução de nanop prata coloidal.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Todas as amostras, incluindo o grupo controle, tiveram os pilares instalados com torque de 30 N, seguindo a recomendação do fabricante, com auxílio de um torquímetro manual (Figura 8).

Figura 8 - Torque no pilar, de acordo com a recomendação do fabricante



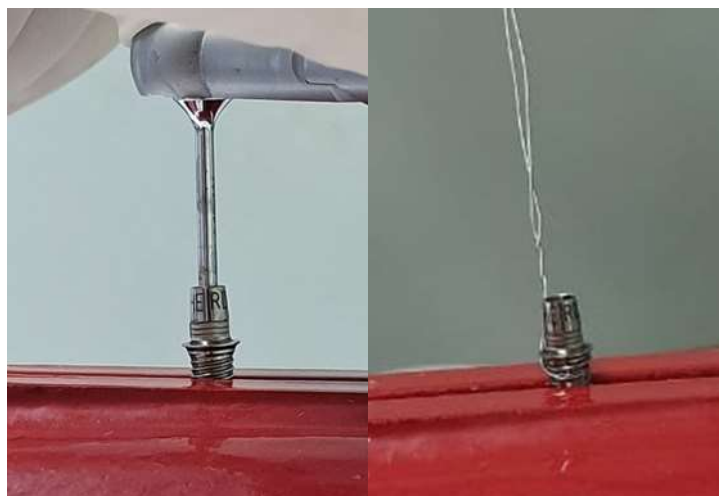
Legenda: Implante estabilizado por morsa para aplicação do torque recomendado pelo fabricante.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar a possível contaminação externa imediata (contaminação primária), cada conjunto implante/pilar foi imerso em caldo BHI em um tubo cônico, cobrindo-se a interface, por 30 s (Figura 10). Os tubos cônicos foram incubados a 37°C em aerobiose por 48 h. As amostras que apresentassem turvação do meio, sinalizando crescimento bacteriano, seriam excluídas do estudo.

O tempo de acompanhamento foi determinado em estudo piloto, no qual as amostras foram acompanhadas por 3, 5 e 7 dias, para determinar o tempo máximo em que todas as amostras apresentariam viabilidade bacteriana.

Cada conjunto foi envolto com fio para amarrilho de Cr-Ni de 0,12 mm de espessura (Figura 9), sendo por ele suspenso e estabilizado em um tubo de ensaio de vidro. Este procedimento foi realizado para que somente a região da interface entre o pilar e o implante se mantivesse em contato com o meio de cultura, descartando-se a possibilidade de contaminação do meio de cultura pelo orifício de acesso ao parafuso (Figura 11). Os tubos foram duplamente fechados, com Parafilm® e a tampa do próprio tubo, para evitar a evaporação do caldo BHI. Um tubo contendo apenas caldo BHI estéril foi usado como controle negativo; outro tubo contendo caldo BHI com 1 µL da suspensão bacteriana serviu como controle positivo. Os tubos foram então incubados a 37°C em aerobiose por 5 dias (Figura 12).

Figura 9- Conjunto Implante/Pilar com fio para amarrilho



Legenda: Conjunto envolto com fio para amarrilho de Cr-Ni de 0,12 mm de espessura.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Procedimento de análise da contaminação externa imediata



Legenda: Implante imerso por 30 segundos em caldo BHI, imediatamente após inoculação, para verificação de possível contaminação externa imediata.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Procedimento para avaliação da contaminação secundária



Legenda: Conjunto implante/pilar suspenso por fio de amarrilho em caldo BHI, com o caldo acima da interface.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12- Procedimento de incubação dos tubos no ensaio de avaliação da contaminação secundária



Legenda: Tubos de ensaio contendo os conjuntos suspensos em caldo para incubação de aerobiose.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi realizado acompanhamento a cada 24h até completar 120 horas de incubação para verificação da possível passagem de bactérias do interior do implante para o caldo (contaminação secundária). O indicativo da ocorrência de infiltração pela interface foi a turvação do meio de cultura.

Após 120 horas de incubação, os conjuntos foram abertos em ambiente estéril (interior da câmara de fluxo laminar)(Figura 13) e o interior dos implantes foi preenchido com solução salina (NaCl 0,9%) estéril (10 µl para os implantes HE - quantidades determinadas em estudo piloto) (Figura14). Um cone de papel endodôntico estéril número 80 (Tanari Ind. Ltda., Manaus, Brasil) foi inserido no interior de cada implante, onde permaneceu por 1 min para absorção do conteúdo. O cone foi removido e inserido em um tubo cônico com 0,5 mL de solução salina estéril (Figura 15). Um segundo cone foi inserido no interior do implante, sendo realizada uma amostragem das paredes internas, e posteriormente também inserido no mesmo tubo cônico.

Figura 13- Reabertura do Implante



Legenda: Destorque do parafuso para remoção do pilar TiBase.
Fonte: Elaborada pelo autor.

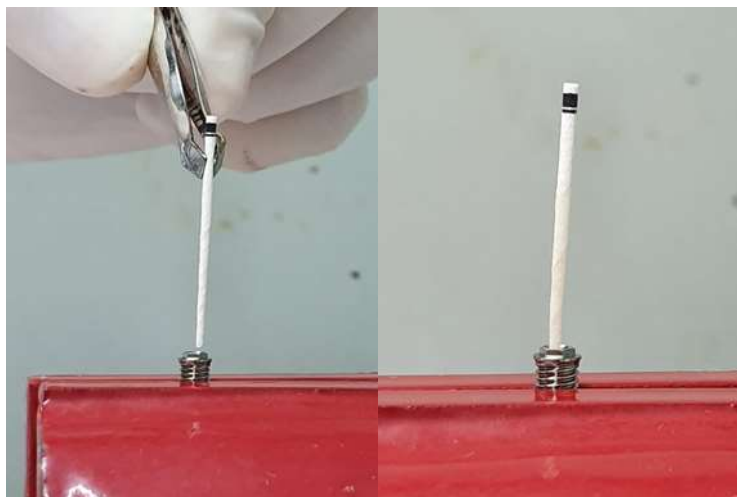
O tubo cônico com os cones de papel foi agitado em vórtex (Vixar, Plymouth, EUA) por 1 min. (Figura 16). A suspensão foi diluída em série até 10^{-2} em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Uma alíquota de 0,01 mL da solução inicial e de suas diluições foi semeada em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI, pela técnica da gota (Figura 17). Após 24 h de incubação a 37°C , realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas. Em caso de não crescimento bacteriano, a amostra foi excluída do estudo.

Figura 14- Solução salina (NaCl 0,9%) estéril no interior do Implante



Legenda: Solução salina(NaCl 0,9%) estéril inserida no interior do implante, após remoção do pilar.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15- Cone de papel endodôntico estéril



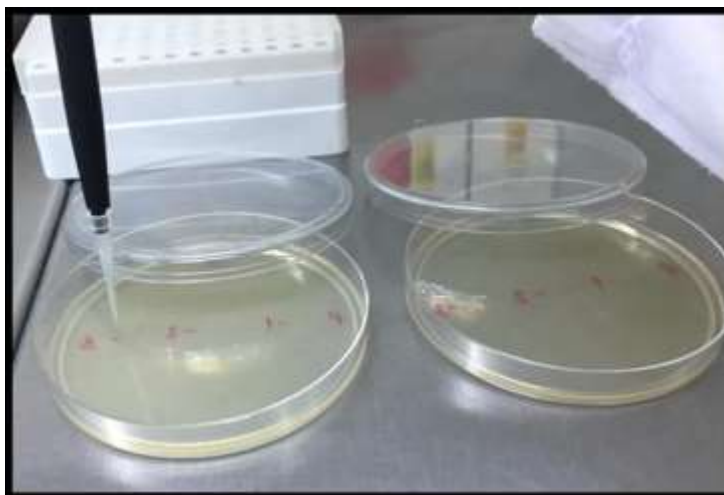
Legenda: Cone de papel endodôntico estéril número 80 (Tanari Ind. Ltda., Manaus, Brasil).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Ressuspensão das bactérias



Legenda: Cone de papel endodôntico estéril no tubo tipo Eppendorf.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 – Plaqueamento do conteúdo dos Implantes em ágar BHI pela técnica da gota



Legenda: Plaqueando em duplicata do conteúdo dos implantes, com diluição de até 10^{-3} .
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada por meio da comparação entre os dados obtidos dos grupos avaliados. A contagem de UFC/mL para os grupos estudados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Graph-Pad Prism 6.1. Foi realizado teste de normalidade, que não mostraram distribuição normal, classificando como amostra não paramétrica. Os dados foram então submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn`s, para a análise entre os grupos. Foi adotado o nível de significância de 5%.

5 RESULTADO

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios realizados mostraram que a concentração inibitória mínima foi de 29 ppm, na qual se observou a inibição total do crescimento visível.

A subcultura (Figura 18) na concentração determinada como inibitória mostrou atividade bacteriostática da prata coloidal nessa concentração.

Figura 18 – Subcultura em ágar brain heart infusion (BHI) na concentração inibitória mínima da nanop prata coloidal



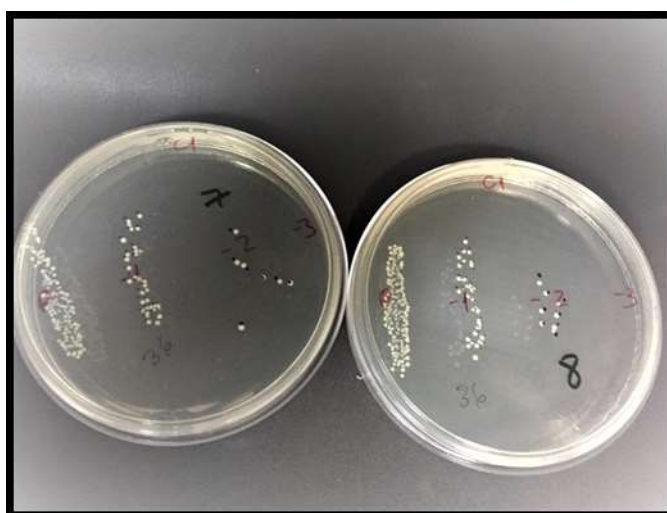
Legenda: Placas de ágar BHI inoculadas com suspensões de *Enterococcus faecalis* tratadas com solução de prata coloidal a 29 ppm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Atividade antimicrobiana da nanop prata coloidal sobre a infiltração bacteriana por *Enterococcus faecalis*

O plaqueamento em ágar BHI da suspensão bacteriana proveniente do interior dos implantes após a remoção dos pilares protéticos resultou no crescimento de colônias típicas de *Enterococcus faecalis* (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Colônias de *Enterococcus faecalis* crescidas no ágar brain heart infusion (BHI) após inoculação da suspensão resultante do implante após o tratamento com a nanop prata na concentração de 29 ppm

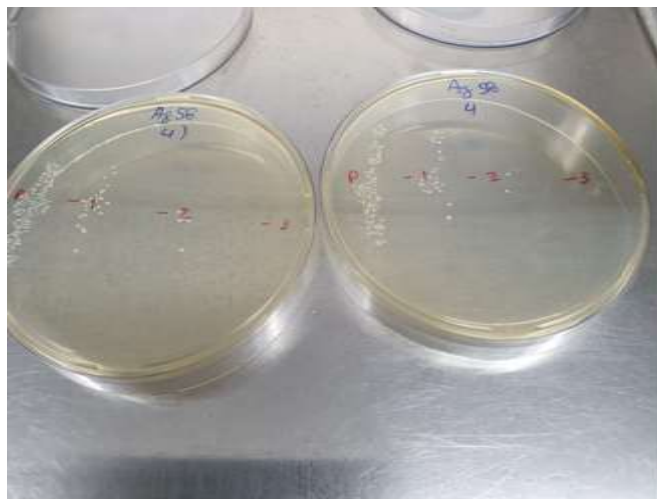


Legenda: Contagem das colônias de *Enterococcus faecalis* após inoculadas em BHI da suspensão inicial P (puro) e diluições 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

A atividade antibiofilme teve melhor efeito bacteriostático da nanop prata coloidal quando foi utilizada a concentração 2 vezes a CIM (58 ppm). Observou-se aumento da taxa de inibição com o aumento da concentração, que se mostrou efetiva em relação ao grupo controle.

Figura 20- Colônias de *Enterococcus faecalis* crescidas no ágar brain heart infusion (BHI) após inoculação da suspensão resultante do implante após tratamento com nanop prata coloidal na concentração de 58 ppm



Legenda: Contagem das colônias de *Enterococcus faecalis* após inoculação em BHI da suspensão inicial (P, puro) e diluições 10^{-1} ; 10^{-2} ; e 10^{-3} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação à avaliação da contaminação imediata (contaminação primária) das amostras, os resultados mostraram que não houve contaminação das amostras analisadas do estudo. Após 120h de incubação, nenhuma amostra apresentou contaminação. Não foi identificada nenhuma contaminação em nenhum dos tempos testados, totalizando 40 conjuntos de implantes avaliados nesse estudo.

5.3 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

A atividade antimicrobiana da solução de nanop prata coloidal pela contagem de UFC/mL estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Estatística descritiva das contagens de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para *Enterococcus faecalis* nos grupos em estudo

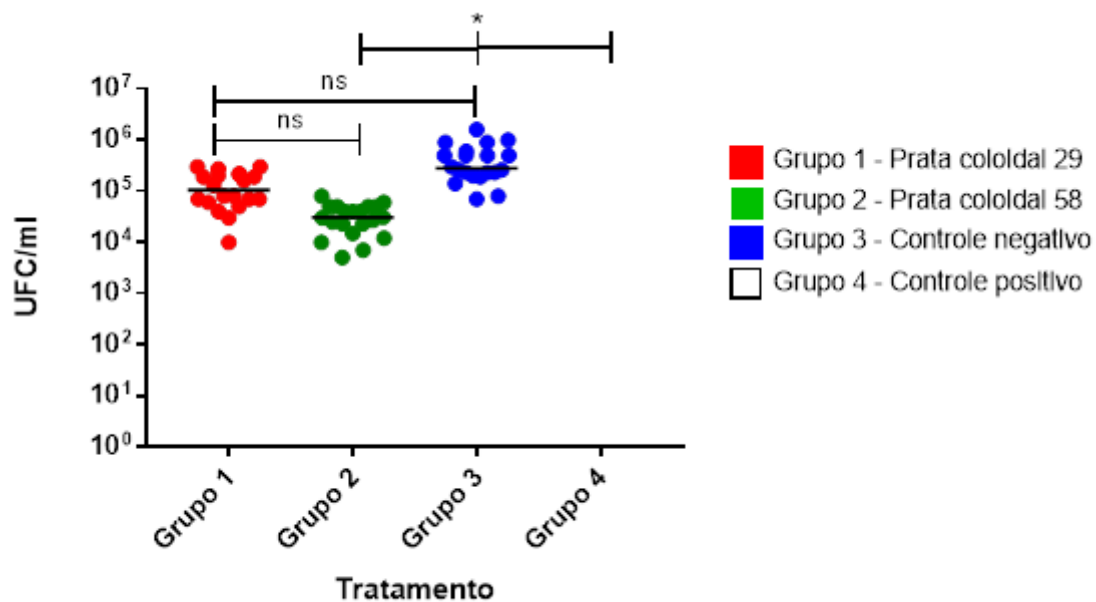
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Número de Amostras	20	20	20	20
Mínimo	1×10^4	5×10^3	7×10^4	0
25%	$6,25 \times 10^4$	$17,00 \times 10^3$	$20,75 \times 10^4$	0
Mediana	$10,50 \times 10^4$	$30,50 \times 10^3$	$28,00 \times 10^4$	0*
75%	$20,75 \times 10^4$	$50,00 \times 10^3$	$57,50 \times 10^4$	0
Máximo	3×10^5	8×10^4	16×10^5	0

Legenda: Grupo 1: Solução de Nanoprata Coloidal 29 ppm; Grupo 2: Solução de Nanoprata Coloidal 58 ppm; Grupo 3: Controle Negativo (Sem tratamento); Grupo 4: Controle Positivo (Solução de digluconato de clorexidina a 2%). * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$.) Teste de Kruskal-Wallis pós-teste de Dunn. Intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O grupo 4 inibiu completamente o crescimento de *E. faecalis*, apresentando contagem nula de UFC/mL, e diferindo estatisticamente de todos os grupos analisados. Quando foram comparados os grupos 1 e 3 entre si, não apresentaram diferença estatisticamente significativa. No entanto, entre o grupo 2 e o grupo 3, a atividade antimicrobiana foi mais elevada, como representados na figura 21. Não houve diferença da redução das contagens bacterianas entre os grupos 1 e o 2.

Figura 21 - Valores de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) obtidos nos grupos em estudo



Legenda: Grupo 1: Solução de Nanoprata Coloidal 29 ppm; Grupo 2: Solução de Nanoprata Coloidal 58 ppm; Grupo 3: Controle Negativo (Sem tratamento); Grupo 4: Controle Positivo (Solução de digluconato de clorexidina a 2%). Diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2- Resultados obtidos no pós-teste de Dunn para comparação estatística dos dados dos grupos em estudo

Teste de Comparação Dunn's	Mediana	p valor	Significância
Grupo 3 x Grupo 1	15,98	0,172	Não
Grupo 3 x Grupo 2	34,5	< 0,0001	Sim
Grupo 3 x Grupo 4	56,83	< 0,0001	Sim
Grupo 1 x Grupo 2	18,53	< 0,0001	Não
Grupo 1 x Grupo 4	40,85	0,0661	Sim
Grupo 2 x Grupo 4	22,33	0,0131	Sim

Legenda: Teste de comparação de Dunn's, observou-se diferença significativa entre os grupos 2 e 3; grupos 3 e 4; grupos 1 e 4; grupos 2 e 4.

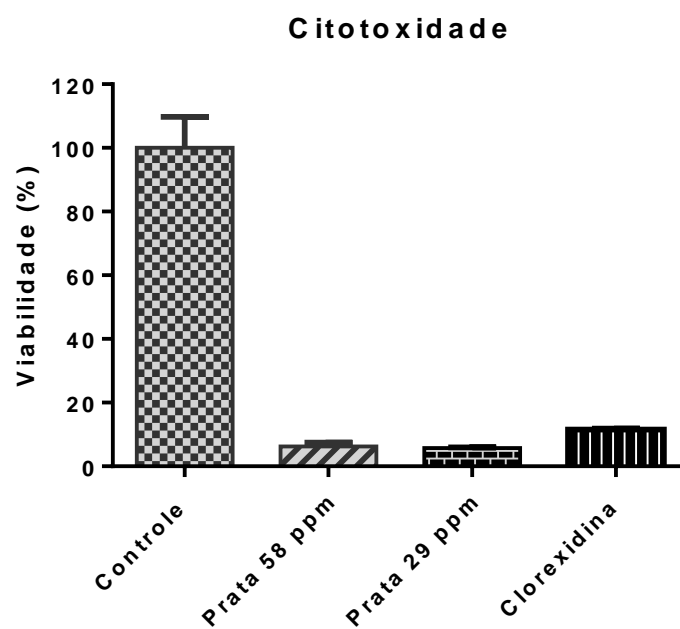
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.1 Avaliação da viabilidade de células Vero (ECACC 84113001)

O teste de viabilidade celular (MTT) é um ensaio de resistência a drogas de cultura celular que fornece resultados rápidos e reproduzíveis, com relevância clínica significativa. No entanto, ele não fornece nenhuma informação sobre o mecanismo molecular de resistência a medicamentos (Hatok et al., 2009).

Os resultados do teste apontaram que as células Vero em contato com a nanop prata nas concentrações de 29 ppm e 58 ppm, com a solução de digluconato de clorexidina a 2%, foram citotóxicas para células Vero após contato por 24 h (Figura 22).

Figura 22 – Viabilidade celular observada nos testes de citotoxicidade das soluções de nanop prata 29 ppm e 58 ppm e solução de digluconato de clorexidina 2%, frente a célula Vero



Legenda: Viabilidade de células Vero (ECACC 84113001).
Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Sendo a periodontite a principal causa de perda dentária em adultos, grande número de pacientes que recebem implantes apresentam um histórico de doença periodontal (Dhir et al., 2013). A patogênese das duas doenças, periimplantite e periodontite estão associadas a presença de patógenos semelhantes e contidos no biofilme, além de fungos orais, e do componente imunológico, responsável pela resposta do hospedeiro (Albrektsson et al., 1994; Albrektsson et al., 2012; Dhir et al., 2013; Lindhe, Meyle, 2008; Retamal-Valdes et al., 2019; Zhao L et al., 2011). A microflora subgengival é inicialmente derivada da placa supragengival. A microbiota associada a implantes saudáveis e com peri-implantite, é semelhante à observada no periodonto saudável e doente ao redor dos dentes. As bactérias bucais indígenas presentes nos dentes remanescentes servem como reservatório para a colonização na superfície do implante, o que explica a similaridade da composição do biofilme ao redor dos dentes e o implante no mesmo indivíduo (Mombelli et al., 2012).

Como alternativa de controle microbiológico, para evitar a formação de biofilme e reduzir a cárie, os estudos buscam materiais de uso local que possuam biocompatibilidade com os tecidos e atividade antimicrobiana, com o intuito de reduzir ou eliminar a resposta inflamatória e como consequência a perda óssea marginal na plataforma dos implantes dentários ao longo do tempo (Besinis et al., 2014; Durner et al., 2011; García-Contreras et al., 2011).

A prata tem sido usada como opção para esse controle microbiano desde que diretamente aplicada na dentina (Besinis et al., 2014), como associada a diversos materiais odontológicos com resina acrílica no tratamento de infecções fúngicas em próteses totais, em cimentos cirúrgicos e cimentos resinosos, entre outros (Metin-Gürsoy et al., 2017; Noronha et al., 2017; Sundeep et al., 2017).

Neste estudo, utilizou-se nanop prata em diferentes concentrações visando estabelecer a melhor relação dose/efeito na sua capacidade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, com baixa toxicidade para as células do hospedeiro.

Enterococcus faecalis é um dos microrganismos, com maior capacidade de se multiplicar em condições extremas como privação nutricional, condições

anaeróbias e com pH elevado (Park et al., 2015). Comumente encontrado em canais radiculares com lesões crônicas, é considerado um dos agentes etiológicos da periodontite apical refratária (Hong et al., 2016). Em relação a peri-implante, a contaminação ocorre durante a osteotomia, uma vez que o microrganismo permanece na superfície óssea, mesmo após extração. Dessa forma, quando um implante é instalado, há a colonização bacteriana, formando um biofilme na superfície do implante dentário (Flanagan, 2017). Além disso, essa espécie bacteriana apresenta alta resistência aos antimicrobianos (Flanagan, 2017; Percival et al., 2015; Rams et al., 2013; Zoletti et al., 2006).

Segundo Wang, *Enterococcus faecalis* induz respostas inflamatórias, o que contribuir para a reabsorção óssea observada na periodontite periapical, promovendo a osteoclastogênese, que é o processo de diferenciação de células mononucleares em osteoclastos e possui importante papel na degradação do osso em patologias inflamatórias crônicas (Wang et al., 2019).

Nos testes preliminares realizados, a nanoprata inibiu o crescimento bacteriano a partir da concentração de 29ppm. No entanto, essa concentração indicou baixa taxa de inibição efetiva para a redução da contagem de UFC/mL no modelo experimental *in vitro* com os implantes dentários.

A clorexidina a 2% é um composto com alta efetividade bactericida com ampla utilização tópica; no entanto apresenta desvantagens quanto à utilização por uso contínuo, como toxicidade e manchamento (Botton et al., 2016; Liu et al., 2018).

A atividade antimicrobiana da solução de nanoprata 58 ppm, corrobora outros resultados como Kowsalya et al. (2019) que realizaram avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 ppm, sobre bactérias relacionadas com alimentos, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Os autores relataram que todos os microrganismos apresentaram halo de inibição para todas as concentrações testadas, sendo as bactérias Gram positivas mais sensíveis que as bactérias Gram negativas. Adomavičiūtė et al. (2016) também demonstrou as propriedades antibacteriana e antifúngica da nanoprata sobre *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*.

A maior ou menor suscetibilidade a nanopartículas de prata é atribuída pela literatura, à diferença da parede celular desses microrganismos (Jokar et al., 2012).

Bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam uma diferença estrutural na parede celular. Bactérias Gram negativas possuem uma fina camada peptidoglicana em sua parede celular, ao passo que bactérias Gram positivas possuem várias camadas dessa molécula, formando uma estrutura espessa e rígida (Mai-Prochnow et al., 2016). Entretanto, bactérias Gram negativas apresentam uma membrana externa, ausente em Gram positivas, que lhes confere proteção frente a determinados agentes externos. Ainda, bactérias Gram-positivas possuem ácidos teicóicos em suas paredes, que possuem carga negativa e auxiliam na entrada e saída de cátions do interior da célula (Tortora et al., 2005), podendo atrair e facilitar a entrada de íons de prata.

No entanto, apesar da efetividade antimicrobiana comprovada, a nanop prata 58 ppm foi severamente tóxica para células eucarióticas (células Vero). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que relataram que a nanopartícula de prata causa várias respostas celulares, incluindo geração de espécies reativas ao oxigênio e morte celular (Galván et al., 2018; McShan et al., 2014; Zhang et al., 2018). Estudos que investigaram o efeito de nanopartículas de prata em diferentes linhagens celulares também relataram respostas tóxicas com concentrações semelhantes usadas neste estudo, como em células de fibroblasto de camundongo (50 e 100 mg / mL), fibroblastos dérmicos humanos (10–200 mg / mL) e células intestinais humanas (5 a 100 mg / mL) (Arora et al, 2009; Braydich-Stolle et al., 2010; Carlson et al., 2008).

Apesar de terem usado diferentes condições experimentais, esses estudos relataram que as nanopartículas de prata causavam respostas toxicológicas influenciadas por características intrínsecas das nanopartículas, como tamanho, forma, química da superfície, cristalinidade, mas também para fatores ambientais como pH, força iônica e presença de ligantes, cátions divalentes e macromoléculas. (Carlson et al., 2008; Choi, Hu, 2008; Kvittek et al., 2008; Lok et al., 2007; Marambio-Jones et al., 2010; Morones et al., 2005; Pal et al., 2007; Smetana et al., 2008).

Segundo alguns estudos, as nanopartículas de prata demonstraram potencial para exercer efeitos imunomoduladores e imunotóxicos (Lappas, 2015). A biocompatibilidade de nanopartículas com células do sistema imunológico é variável, mas parece ser dependente da dose, induzindo graves alterações morfológicas, por serem transportadas através das membranas celulares, especialmente para as

mitocôndrias, que desempenham função importante na bioenergética celular, por distribuírem a energia que produzem por toda a célula, desempenhando um papel essencial na homeostase celular, danos ao DNA e apoptose (Foley et al., 2002; Lappas, 2015; Mohammadinejad et al., 2019; Wei et al., 2010; Zanette et al., 2011).

Entretanto, estudos sugerem que, ao ser incorporada a materiais, pode haver redução da toxicidade da nanoprata. Adesivo dentinário associado a nanoprata apresentou citotoxicidade frente a fibroblastos semelhante ao controle sem tratamento (Li et al., 2013; Sabatini et al., 2015).

Em relação à adaptação, sabe-se que existe uma microfenda na interface pilar/implante. E estudos *in vitro* demonstraram que o desenho da interface está relacionado com a quantidade de penetração microbiana no interior do implante independentemente do tipo de sistemas (Tsuge et al., 2008).

As plataformas do tipo hexágono externo falham mais em impedir a penetração microbiana tanto sob a aplicação de forças oclusais, quanto quando não recebem esforço mastigatório, e esta interface servirá de reservatório de microrganismos e outras substâncias tóxicas, tendo um impacto na inflamação peri-implantar (do Nascimento et al., 2008; Jansen et al., 1997; Koutouzis et al., 2011; Quirynen et al., 1994; Sasada et al., 2017). Quando sob forças oclusais, ocorre o efeito de bombeamento na região peri-implantar, além da contaminação interna do implante por bactérias (Baixe et al., 2016; Koutouzis et al., 2014).

No conjunto Implante/Pilar TiBase, foi observado nessa pesquisa que não houve extravasamento bacteriano em nenhum dos grupos avaliados, diferentemente de trabalhos anteriores, que utilizando a mesma plataforma do tipo hexágono externo, obtiveram altas taxas de extravasamento e contaminação das amostras, com a perda de amostras no decorrer do estudo (Cardoso et al., 2016; Guerra et al., 2016). Essa diferença nos resultados sugere que a adaptação do pilar protético utilizado na pesquisa apresenta melhor vedamento da interface entre pilar protético e implante.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a solução de nanop prata coloidal foi bacteriostática frente a *Enterococcus faecalis*, na concentração de 58ppm. No entanto, essa solução de nanop prata coloidal demonstrou ser severamente tóxica para células eucarióticas. E estudos futuros para o desenvolvimento de formulações contendo nanopartículas de prata viáveis para o tratamento da peri-implantite são necessários.

REFERÊNCIAS*

- Abduo J, Lyons K, Bennamoun M. Trends in computer-aided manufacturing in prosthodontics: a review of the available streams. *Int J Dent.* 2014; 2014:783948. doi: 10.1155/2014/783948. Epub 2014 Apr 8. Review. PubMed PMID: 24817888; PubMed Central PMCID: PMC4000974.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981 Dec; 10(6):387-416. PubMed PMID: 6809663.
- Adomavičiūtė E, Stanys S, Žilius M, Juškaitė V, Pavilionis A, Briedis V. Formation and biopharmaceutical characterization of electrospun PVP mats with propolis and silver nanoparticles for fast releasing wound dressing. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:4648287. doi:10.1155/2016/4648287. Epub 2016 Feb 14. PubMed PMID: 26981531; PubMed Central PMCID: PMC4769747.
- Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res.* 2017 Nov 2; 9:1-16. doi:10.1016/j.jare.2017.10.008. eCollection 2018 Jan. Review. PubMed PMID: 30046482; PubMed Central PMCID: PMC6057238.
- Al-Meraikhi H, Yilmaz B, McGlumphy E, Brantley W, Johnston WM. *In vitro* fit of CAD-CAM complete arch screw-retained titanium and zirconia implant prostheses fabricated on 4 implants. *J Prosthet Dent.* 2018 Mar; 119(3):409-16. doi:10.1016/j.prosdent.2017.04.023. Epub 2017 Jul 15. PubMed PMID: 28720339.
- Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981; 52(2):155–70. doi:10.3109/17453678108991776.
- 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 Summer;1(1):11-25. Review. PubMed PMID: 3527955.
- Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. *Periodontol 2000.* 1994 Feb;4:58-73. Review. PubMed PMID: 9673194.
- Albrektsson T, Buser D, Sennerby L. On crestal/marginal bone loss around dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012 Jul-Aug;27(4):736-8. PubMed PMID: 22848874

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 May 1;236(3):310-8. doi: 10.1016/j.taap.2009.02.020. Epub 2009 Mar 6. PubMed PMID: 19269301.

Baixa S, Tenenbaum H, Etienne O. Pénétration microbienne dans la connectique pilier-implant: revue de littérature [Microbial contamination of the implant-abutment connections: Review of the literature]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*. 2016;117(1):20–5. doi:10.1016/j.revsto.2015.11.004

Beuer F, Schweiger J, Edelhoff D. Digital dentistry: an overview of recent developments for CAD/CAM generated restorations. *Br Dent J*. 2008;204(9):505–11. doi:10.1038/sj.bdj.2008.350

Besinis A, De Peralta T, Handy RD. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. *Nanotoxicology*. 2014 Nov; 8(7):745-54. doi:10.3109/17435390.2013.825343. Epub 2013 Aug 7. PubMed PMID: 23875717.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2):81-100. PubMed PMID: 4924041

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977; 16:1-132. PubMed PMID: 356184.

Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson, T.A. Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry. Issue 3. Chicago: Quintessence; March 1986. Volume 77.

Bazrafshan N, Darby I. Retrospective success and survival rates of dental implants placed with simultaneous bone augmentation in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Jul;25(7):768-73. doi: 10.1111/clr.12185. Epub 2013 May 5. PubMed PMID: 23647237.

Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1: S313-18. doi: 10.1002/JPER.17-0739. PubMed PMID: 29926955.

Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IB, et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J*. 2016 Aug; 49(8):746-54. doi: 10.1111/iej.12509. Epub 2015 Aug 6. PubMed PMID: 26175042.

Botzenhart U, Kunert-Keil C, Heinemann F, Gredes T, Seiler J, Berniczei-Roykó Á, et al. Osseointegration of short titan implants: A pilot study in pigs. *Ann Anat.* 2015 May;199:16-22. doi:10.1016/j.aanat.2014.02.011. [Epub 2014 Mar 27].PubMed PMID: 24780612.

Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, Lee T, Schlager JJ, et al. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci.* 2010 Aug; 116(2):577-89. doi:10.1093/toxsci/kfq148. Epub 2010 May 20. PubMed PMID: 20488942; PubMed Central PMCID: PMC2905406.

Busscher HJ, van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Oct; 63(10):3810-7. PubMed PMID: 9327543; PubMed Central PMCID: PMC168689.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993; 13(1):29-45. PubMed PMID: 8330945.

Cao H, Liu X. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010; 2(6):670–84. doi:10.1002/wnan.113

Carotenuto G, Palumbo M, Zarone F, Nicolais L. Characterization of the interface between prefabricated gold copings and cast dental alloy in implant restorations. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10(2):131–8. doi:10.1034/j.1600-0501.1999.00207.x

Carcuac O, Derks J, Charalampakis G, Abrahamsson I, Wennström J, Berglundh T. Adjunctive systemic and local antimicrobial therapy in the surgical treatment of peri-implantitis: a randomized controlled clinical trial. *J Dent Res.* 2016 Jan; 95(1):50-7. doi:10.1177/0022034515601961. [Epub 2015 Aug 18]. PubMed PMID: 26285807.

Cardaropoli G, Lekholm U, Wennström JL. Tissue alterations at implant-supported single-tooth replacements: a 1-year prospective clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):165-71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01210.x>

Cardoso M, Sangalli J, Koga-Ito CY, Ferreira LL, da Silva Sobrinho AS, Nogueira L Jr. Abutment coating with diamond-like carbon films to reduce implant-abutment bacterial leakage. *J Periodontol.* 2016 Feb;87(2): 168-74. doi:10.1902/jop.2015.150362. Epub 2015 Oct 29. PubMed PMID: 26513267.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B.* 2008 Oct 30; 112(43):13608-19. doi:10.1021/jp712087m. Epub 2008 Oct 3. PubMed PMID: 18831567.

Cazalini EM, Miyakawa W, Teodoro GR, Sobrinho ASS, Matieli JE, Massi M, et al. Antimicrobial and anti-biofilm properties of polypropylene meshes coated with metal-containing DLC thin films. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Jun;28(6):97. doi:10.1007/s10856-017-5910-y. Epub 2017 May 17. PubMed PMID:28560581

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Reasons for failures of oral implants. *J Oral Rehabil*. 2014 Jun; 41(6):443-76. doi: 10.1111/joor.12157. Epub 2014 Mar 11. Review. PubMed PMID: 24612346.

Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Immediately loaded non-submerged versus delayed loaded submerged dental implants: a meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Apr; 44(4):493-506. doi: 10.1016/j.ijom.2014.11.011. [Epub 2014 Dec 23. Review] PubMed PMID: 25541014.

Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother*. 2007 Apr; 59(4):587-90. [Epub 2007 Feb 16. Review]. PubMed PMID: 17307768.

Dhir S, Mahesh L, Kurtzman GM, Vandana KL. Peri-implant and periodontal tissues: a review of differences and similarities. *Compend Contin Educ Dent*. 2013 Jul-Aug; 34(7):e69-75. Review. PubMed PMID: 24428439.

Durner J, Stojanovic M, Urcan E, Hickel R, Reichl FX. Influence of silver nanoparticles on monomer elution from light-cured composites. *Dent Mater*. 2011;27(7):631–6. doi: 10.1016/j.dental.2011.03.003

do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque RF Jr. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Feb; 37(2):177-80. Epub 2007 Oct 10. PubMed PMID: 17931833.

do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Gonçalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, et al. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: *in vitro* evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 May-Jun; 27(3):551-60. PubMed PMID: 22616048.

Eggert FM, Levin L. Biology of teeth and implants: the external environment, biology of structures, and clinical aspects. *Quintessence Int*. 2018;49(4):301-12. doi: 10.3290/j.qi.a38544. Review. PubMed PMID: 28681042.

Edgerton M, Levine MJ. Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent*. 1993; 69(4):406–15. doi: 10.1016/0022-3913(93)90190-y

Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 2009 Autumn; 2(3):167-84. Review. PubMed PMID: 20467628.

Flanagan D. *Enterococcus faecalis* and dental implants. *J Oral Implantol*. 2017 Feb; 43(1):8-11. doi: 10.1563/aaid-joi-D-16-00069.

Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 31; 294(1):116-9. PubMed PMID: 12054749.

Freitas-Júnior AC, Almeida EO, Bonfante EA, Silva NR, Coelho PG. Reliability and failure modes of internal conical dental implant connections. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Feb; 24(2):197-202. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02443.x.

Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug; 18(4):501-8. Epub 2007 May 15. PubMed PMID: 17501978.

Galindo-Moreno P, León-Cano A, Ortega-Oller I, Monje A, O Valle F, Catena A. Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry: beyond 2 mm. *Clin Oral Implants Res*. 2015 Apr; 26(4):e28-e34. doi: 10.1111/clr.12324. [Epub 2014 Jan 3]. PubMed PMID: 24383987.

Galván Márquez I, Ghiyasvand M, Massarsky A, Babu M, Samanfar B, Omid K, et al. Zinc oxide and silver nanoparticles toxicity in the baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2018 Mar 19; 13(3): e0193111. doi:10.1371/journal.pone.0193111 PubMed Central PMCID: PMC5858749.

García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J*. 2011 Dec; 61(6):297-301. doi: 10.1111/j.1875-95X.2011.00072.x. Epub 2011 Nov 8. Review. PubMed PMID: 22117785.

Garrana R, Mohangi G, Malo P, Nobre M. Leakage of microbial endotoxin through the implant-abutment interface in oral implants: an *in vitro* study. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:9219071. doi: 10.1155/2016/9219071. [Epub 2016 Dec 29]. PubMed PMID: 28127552; PubMed Central PMCID: PMC5227122.

Gould FK, Brindle R, Chadwick PR, Fraise AP, Hill S, Nathwani D, et al. Guidelines (2008) for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2009 May; 63(5):849-61. doi: 10.1093/jac/dkp065. [Epub 2009 Mar 12]. Review. PubMed PMID: 19282331.

Goodacre CJ, Garbacea A, Naylor WP, Daher T, Marchack CB, Lowry J. CAD/CAM fabricated complete dentures: concepts and clinical methods of obtaining required morphological data. *J Prosthet Dent*. 2012; 107(1):34-46. doi: 10.1016/S0022-3913(12)60015-8

Guerra E, Pereira C, Faria R, Jorge AO, Bottino MA, de Melo RM. The impact of conical and nonconical abutments on bacterial infiltration at the implant-abutment interface. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2016 Nov/Dec; 36(6):825-831. doi: 10.11607/prd.2779. PubMed PMID: 27740643.

Groenendijk E, Dominicus JJ, Moorer WR, Aartman IH, van Waas MA. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 3I-Titamed implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Apr; 15(2):174-9. PubMed PMID: 15085873.

Hamilton A, Judge RB, Palamara JE, Evans C. Evaluation of the fit of CAD/CAM abutments. *Int J Prosthodont*. 2013;26(4):370–80. doi:10.11607/ijp.3501

Harder S, Dimaczek B, Açil Y, Terheyden H, Freitag-Wolf S, Kern M. Molecular leakage at implant-abutment connection-*in vitro* investigation of tightness of internal conical implant-abutment connections against endotoxin penetration. *Clin Oral Investig*. 2010 Aug;14(4):427-32. doi: 10.1007/s00784-009-0317-x. [Epub 2009 Jul 23]. PubMed PMID: 19629543.

Harris LG, Mead L, Müller-Oberländer E, Richards RG. Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):50-8. PubMed PMID: 16602121

Hasan I, Heinemann F, Bourauel C. Biomechanical finite element analysis of self-tapping implants with different dimensions inserted in two bone qualities. *Biomed Tech (Berl)*. 2014 Jun; 59(3):203-12. doi: 10.1515/bmt-2013-0109. PubMed PMID: 24695023.

Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009;9(1):1–7. doi:10.1007/s10238-008-0011-3

Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int J Nanomedicine*. 2017 Nov 10; 12:8211-8225. doi: 10.2147/IJN.S132163. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29184409; PubMed Central PMCID: PMC5689025.

Heberer S, Hildebrand D, Nelson K. Survival rate and potential influential factors for two transitional implant systems in edentulous patients: a prospective clinical study. *J Oral Rehabil*. 2011 Jun; 38(6):447-53. doi: 10.1111/j.1365-2842.2010.02166.x. [Epub 2010 Nov 11]. PubMed PMID: 21070328.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Kum KY, Yun CH, Han SH. Sodium hypochlorite inactivates lipoteichoic acid of *enterococcus faecalis* by deacylation. *J Endod*. 2016; 42(10):1503–8. doi:10.1016/j.joen.2016.06.018

Hou GQ, Guo C, Song GH, Fang N, Fan WJ, Chen XD, et al. Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):503-10. doi: 10.3892/ijmm.2013.1406. [Epub 2013 Jun 5]. PubMed PMID: 23740407.

Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Jul-Aug; 12(4):527-40. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 Sep-Oct; 12(5):709. PubMed PMID: 9274082.

Javed F, Ahmed HB, Crespi R, Romanos GE. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: factors of influence and evaluation. *Interv Med Appl Sci*. 2013 Dec; 5(4):162-7. doi: 10.1556/IMAS.5.2013.4.3. [Epub 2013 Dec 20]. Review. PubMed PMID: 24381734; PubMed Central PMCID: PMC3873594.

Jokar M, Abdul Rahman R, Ibrahim NA, Abdullah LC, Tan CP. Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food Bioprocess Technol*. 2012; 5(2):719–28. DOI 10.1007/s11947-010-0329-1

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 Feb; 19(2):119-30. [Epub 2007 Dec 7. Review]. PubMed PMID: 18067597.

Kang J, Dietz MJ, Hughes K, Xing M, Li B. Silver nanoparticles present high intracellular and extracellular killing against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*. 2019 Feb 18. pii: dkz053. doi: 10.1093/jac/dkz053. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30778552

Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*. 2000 Mar; 26(2):117-30. PubMed PMID: 10716354.

Klinge B. Peri-implant marginal bone loss: an academic controversy or a clinical challenge? *Eur J Oral Implantol*. 2012; 5 Suppl:S13-9. Review. PubMed PMID: 22834391.

Koka S, Razzoog ME, Bloem TJ, Syed S. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. *J Prosthet Dent*. 1993 Aug; 70(2):141-4. PubMed PMID: 8396644.

Koutouzis T, Wallet S, Calderon N, Lundgren T. Bacterial colonization of the implant-abutment interface using an *in vitro* dynamic loading model. *J Periodontol*. 2011 Apr; 82(4):613-8. doi: 10.1902/jop.2010.100415. [Epub 2010 Nov 2] PubMed PMID: 21043798.

Koutouzis T, Mesia R, Calderon N, Wong F, Wallet S. The effect of dynamic loading on bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an *in vitro* study. *J Oral Implantol*. 2014; 40(4):432–7. doi:10.1563/AAID-JOI-D-11-00207

Koutouzis T, Gadalla H, Kettler Z, Elbarasi A, Nonhoff J. The role of chlorhexidine on endotoxin penetration to the implant-abutment interface (IAI). *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015 Jun; 17(3):476-82. doi: 10.1111/cid.12158. [Epub 2013 Sep 23]. PubMed PMID: 24112587.

Koutouzis T, Gadalla H, Lundgren T. Bacterial colonization of the implant-abutment interface (iai) of dental implants with a sloped marginal design: an in-vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016 Feb; 18(1):161-7. doi: 10.1111/cid.12287. [Epub 2015 Jan 27]. PubMed PMID: 25623033.

Kowsalya E, Mosa Christas K, Balashanmugam P, Tamil Selvi A, Jaqueline Chinna Rani. Biocompatible silver nanoparticles/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2019; 21 (September 2018):100379. doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.10037

Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002 Apr; 11(4):125-30. Review. PubMed PMID: 11998592.

Lang NP, Berglundh T; Working group 4 of seventh european workshop on periodontology. Periimplant diseases: where are we now?-consensus of the seventh european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar; 38 Suppl 11:178-81. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x. PubMed PMID: 21323713

Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jiménez MJ, Jose-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology*. 2015 Dec 15; 13:91. doi:10.1186/s12951-015-0147-8. PubMed PMID: 26666378; PubMed Central PMCID: PMC4678641

Li F, Weir MD, Chen J, Xu HH. Comparison of quaternary ammonium containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. *Dent Mater*. 2013 Apr; 29(4):450-61. doi: 10.1016/j.dental.2013.01.012. Epub 2013 Feb 18. PubMed PMID: 23428077; PubMed Central PMCID: PMC3631003

Lindhe J, Meyle J, Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep; 35(8 Suppl):282-5. doi: 10.1111/j.160051X.2008.01283.x. PubMed PMID: 18724855.

Listgarten MA. Microorganisms and dental implants. *J Periodontol*. 1999 Feb; 70(2):220-2. PubMed PMID: 10102562.

Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect*. 2018 Aug 10; 3(4):165-72. doi: 10.7150/jbji.26355. eCollection 2018. PubMed PMID: 30155401; PubMed Central PMCID: PMC6098817.

Lorenz J, Giuliani N, Hölscher W, Schwiertz A, Schwarz F, Sader R. Prospective controlled clinical study investigating long-term clinical parameters, patient satisfaction, and microbial contamination of zirconia implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Apr; 21(2):263-71. doi: 10.1111/cid.12720. Epub 2019 Feb 4. PubMed PMID: 30714303.

Macedo JP, Pereira J, Vahey BR, Henriques B, Benfatti CA, Magini RS, et al. Morse taper dental implants and platform switching: The new paradigm in oral implantology. *Eur J Dent*. 2016 Jan-Mar; 10(1):148-54. doi:10.4103/1305-7456.175677. Review. PubMed PMID: 27011755; PubMed Central PMCID: PMC4784146.

Machado LS, Bonfante EA, Anchieta RB, Yamaguchi S, Coelho PG. Implant-abutment connection designs for anterior crowns: reliability and failure modes. *Implant Dent*. 2013 Oct; 22(5):540-5. doi: 10.1097/ID.0b013e31829f1f2d. PubMed PMID: 24013394.

Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep*. 2016 Dec 9; 6:38610. doi: 10.1038/srep38610. PubMed PMID: 27934958; PubMed Central PMCID: PMC5146927.

Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12, 1531–1551 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>

Matsubara VH, Igai F, Tamaki R, Tortamano Neto P, Nakamae AE, Mori M. Use of silver nanoparticles reduces internal contamination of external hexagon implants by candida albicans. *Braz Dent J*. 2015 Oct; 26(5):458-62. doi: 10.1590/0103-644020130087. PubMed PMID: 26647928.

McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal*. 2014 Mar; 22(1):116-127. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.010. Epub 2014 Feb 7. Review. PubMed PMID: 24673909; PubMed Central PMCID: PMC4281024.

Metin-Gürsoy G, Taner L, Akca G. Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *Eur J Orthod*. 2017 Feb; 39(1):9-16. doi: 10.1093/ejo/cjv097. Epub 2016 Jan 18. PubMed PMID: 26787659

Misch CE, Perel ML, Wang HL, Sammartino G, Galindo-Moreno P, Trisi P, et al. Implant success, survival, and failure: The international congress of oral implantologists (ICOI) Pisa Consensus Conference. *Implant Dent*. 2008 Mar;17(1):5-15. doi:0.1097/ID.0b013e3181676059 PubMed PMID: 18332753.

Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the different implant abutment interface: a systematic review. *J Clin Diagn Res*. 2017 Jun; 11(6):ZE10-ZE15. doi: 10.7860/JCDR/2017/28951.10054. [Epub 2017 Jun]. Review. PubMed PMID: 28764310.

Miyazaki T, Hotta Y, Kunii J, Kuriyama S, Tamaki Y. A review of dental CAD/CAM: current status and future perspectives from 20 years of experience. *Dent Mater J*. 2009; 28(1):44–56. doi:10.4012/dmj.28.44

Mizumoto RM, Yilmaz B. Intraoral scan bodies in implant dentistry: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2018 Sep; 120(3):343-52. doi:10.1016/j.prosdent.201710.029. [Epub 2018 Apr 5.] PubMed PMID: 29627211.

Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S, Vardar DÖ, Hosseini A, Rahmati M, et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*. 2019 Jan; 15(1):4-33. doi: 10.1080/15548627.2018.1509171. Epub 2018 Sep 13. PubMed PMID: 30160607; PubMed Central PMCID: PMC6287681.

Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Oct; 23 Suppl 6:67-76. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02541.x. Review. PubMed PMID: 23062130.

Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Mar; 44(3):377-88. doi: 10.1016/j.ijom.2014.10.023. [Epub 2014 Nov 20.Review]. PubMed PMID: 25467739

Muley N, Prithviraj DR, Gupta V. Evolution of External and Internal Implant to Abutment Connection. *Int J Oral Implantol Clin Res* 2012;3(3):122-9.

Nandi SK, Shivaram A, Bose S, Bandyopadhyay A. Silver nanoparticle deposited implants to treat osteomyelitis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Apr; 106(3):1073-83. doi: 10.1002/jbm.b.33910. [Epub 2017 May 15]. PubMed PMID:28508595; PubMed Central PMCID: PMC5685947.

Nascimento CD, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Mar; 25(3):337-43. doi: 10.1111/clr.12093. [Epub 2013 Jan 14]. PubMed PMID: 23316996.

Nascimento Cd, Ikeda LN, Pita MS, Pedroso e Silva RC, Pedrazzi V, Albuquerque RF, et al. Marginal fit and microbial leakage along the implant-abutment interface of fixed partial prostheses: An *in vitro* analysis using Checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Prosthet Dent*. 2015 Dec; 114(6):831-8. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.05.009. [Epub 2015 Sep 8]. PubMed PMID: 26359546. 8.

Nascimento Cd, Pita MS, Santos EdeS, Monesi N, Pedrazzi V, Albuquerque Junior RF, et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent Mater*. 2016 Jan;32(1):93-101. doi: 10.1016/j.dental.2015.10.014. Epub 2015 Nov 23. PubMed PMID: 26616687.

Niznick G. The implant abutment connection: the key to prosthetic success. *Compendium*. 1991 Dec; 12(12):932, 934-8. PubMed PMID: 1814589.

Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater*. 2017Oct;33(10):1110-26. doi: 10.1016/j.dental.2017.07.002. Epub 2017 Aug 2. Review.PubMed PMID: 28779891.

Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: myth or science. *J Periodontol*. 2002 Mar; 73(3):322-33. Review. PubMed PMID: 11922263.

Örtorp A, Jemt T. CNC-milled titanium frameworks supported by implants in the edentulous jaw: a 10-year comparative clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012 Mar; 14(1):88-99. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00232.x. [Epub 2009 Aug17]. PubMed PMID: 19686283.

Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S, Graziani F, Catamo G, Sammartino G, et al. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. *J Periodontol*. 2008 Aug; 79(8):1419-25. doi: 10.1902/jop.2008.070660. PubMed PMID: 18672991.

Papaspyridakos P, Chen CJ, Singh M, Weber HP, Gallucci GO. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. *J Dent Res*. 2012 Mar;91(3):242-8. doi: 10.1177/0022034511431252. [Epub 2011 Dec 8. Review]. PubMed PMID: 22157097.

Park OJ, Kim J, Yang J, Yun CH, Han SH. *Enterococcus faecalis* Inhibits Osteoblast Differentiation and Induces Chemokine Expression. *J Endod*. 2015; 41(9):1480–1485. doi:10.1016/j.joen.2015.04.025

Passos SP, Gressler May L, Faria R, Özcan M, Bottino MA. Implant-abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 Oct; 101(7):1321-8. doi:10.1002/jbm.b.32945.[Epub 2013 May 10. Review]. PubMed PMID: 23661560.

Penarrocha-Oltra D, Monreal-Bello A, Penarrocha-Diago M, Alonso-Perez-Barquero J, Botticelli D, Canullo L. Microbial colonization of the peri-implant sulcus and implant connection of implants restored with cemented versus screw-retained superstructures: a cross-sectional study. *J Periodontol*. 2016 Sep; 87(9):1002-11. doi:10.1902/jop.2016.160017. [Epub 2016 May 6]. PubMed PMID: 27153291.

Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 2015 Apr;64(Pt 4):323-34. doi: 10.1099/jmm.0.000032. Epub 2015 Feb 10. Review. PubMed PMID: 25670813.

Pesce P, Pera F, Setti P, Menini M. Precision and accuracy of a digital impression scanner in full-arch implant rehabilitation. *Int J Prosthodont*. 2018; 31(2):171–75. doi:10.11607/ijp.5535

Pjetursson BE, Karoussis I, Bürgin W, Brägger U, Lang NP. Patients' satisfaction following implant therapy. A 10-year prospective cohort study. *Clin Oral Implants Res*. 2005 Apr; 16(2):185-93. PubMed PMID: 15777328.

Pjetursson BE, Thoma D, Jung R, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Oct; 23 Suppl 6:22-38. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02546.x. Review. PubMed PMID: 23062125.

Podhorsky A, Putzier S, Rehmann P, Streckbein P, Domann E, Wöstmann B. Bacterial contamination of the internal cavity of dental implants after application of disinfectant or sealant agents under cyclic loading *in vitro*. *Int J Prosthodont*. 2016 Sep-Oct; 29(5):493-5. doi: 10.11607/ijp.4546. PubMed PMID: 27611755.

Presotto AG, Bhering CL, Mesquita MF, Barão VA. Marginal fit and photoelastic stress analysis of CAD-CAM and overcast 3-unit implant-supported frameworks. *J Prosthet Dent*. 2017 Mar;117(3):373-79. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.06.011. Epub2016 Sep 22. PubMed PMID: 27666497.

Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):239-44. PubMed PMID: 7640338.

Ramos MP, Ferreira SM, Silva-Boghossian CM, Souto R, Colombo AP, Noce CW, et al. Necrotizing periodontal diseases in HIV-infected Brazilian patients: a clinical and microbiologic descriptive study. *Quintessence Int*. 2012 Jan;43(1):71-82. PubMed PMID: 22259811.

Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. *Enterococci* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1992 Aug;7(4):249-52. PubMed PMID 1408361.

Rams TE, Feik D, Mortensen JE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility of periodontal *Enterococcus faecalis*. *J Periodontol*. 2013 Jul;84(7):1026-33. doi: 10.1902/jop.2012.120050. [Epub 2012 Oct 29]. PubMed PMID:23106507.

Ready D, Theodoridis G, Green I, Ciric L, Pratten J, Tay W, McDonald A. *In vitro* evaluation of the antibiofilm properties of chlorhexidine and delmopinol on dental implant surfaces. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Jun; 45(6):662-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.01.020. Epub 2015 Mar 14. PubMed PMID: 25963339.

Retamal-Valdes B, Formiga MC, Almeida ML, Fritoli A, Figueiredo KA, Westphal M, et al. Does subgingival bacterial colonization differ between implants and teeth? A systematic review. *Braz Oral Res*. 2019 Sep 30;33(suppl 1):e064. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0064. eCollection 2019. PubMed PMID: 31576948.

Romanos GE, Biltucci MT, Kokaras A, Paster BJ. Bacterial composition at the implant-abutment connection under loading *in vivo*. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016 Feb; 18(1):138-45. doi: 10.1111/cid.12270. Epub 2014 Sep 5. PubMed PMID:25195711.

Roos-Jansåker 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 Apr; 33(4):290-5. PubMed PMID: 16553638

Solá-Ruiz MF, Selva-Otaola E, Senent-Vicente G, González-de-Cossio I, Amigó-Borrás V. Accuracy combining different brands of implants and abutments. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2): e332–6. Published 2013 Mar 1. doi: 10.4317/medoral.18137.

Sundeeep D, Vijaya Kumar T, Rao PSS, Ravikumar RVSSN, Gopala Krishna A. Green synthesis and characterization of Ag nanoparticles from *Mangifera indica* leaves for dental restoration and antibacterial applications. *Prog Biomater*. 2017 May;6(1-2):57-66. doi: 10.1007/s40204-017-0067-9. Epub 2017 May 3. PubMed PID: 28470622; PubMed Central PMCID: PMC5433963.

Sabatini C, Mennito AS, Wolf BJ, Pashley DH, Renné WG. Incorporation of bactericidal poly-acrylic acid modified copper iodide particles into adhesive resins. *J Dent*. 2015 May; 43(5):546-55. doi: 10.1016/j.jdent.2015.02.012. Epub 2015 Feb 27. PubMed PMID: 25731156; PubMed Central PMCID: PMC5788176.

Sasada Y, Cochran DL. Implant-abutment connections: a review of biologic consequences and peri-implantitis implications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Nov/Dec; 32(6):1296-307. doi: 10.11607/jomi.5732. Review. PubMed PMID: 29140374.

Scarano A, Assenza B, Piattelli M, Iezzi G, Leghissa GC, Quaranta A, et al. A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments. *J Oral Implantol*. 2005;31(6):269-75. PubMed PMID: 16447899.

Schroeder A, Pohler O, Sutter F. [Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*. 1976 Jul; 86(7):713-27. German. PubMed PMID: 822512.

Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 1999 Dec;57(6):316-22. PubMed PMID: 10777134.

Steflik DE, Corpe RS, Young TR, Buttle K. In vivo evaluation of the biocompatibility of implanted biomaterials: morphology of the implant-tissue interactions. *Implant Dent*. 1998;7(4):338–50. doi: 10.1097/00008505-199807040-00013

Sousa ECP de. Mecanismos de ação de nanopartículas de prata no comportamento de propriedades mecânicas celulares [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Física; 2018. doi: 10.11606/T.43.2018.tde-25062018-110113.

Steinebrunner L, Wolfart S, Bössmann K, Kern M. *In vitro* evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Nov-Dec;20(6):875-81. PubMed PMID: 16392344.

Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jul-Aug; 24(4):616-26. Review. PubMed PMID: 19885401.

Sun J, Song X, Kristiansen BE, Kjaereng A, Willems RJ, Eriksen HM, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of *enterococci* in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2009 Jul; 47(7):2218-25. doi: 10.1128/JCM.00388-09. [Epub 2009 May 6]. PubMed PMID: 19420168; PubMed Central PMCID: PMC2708501.

Talebi Ardakani MR, Meimandi M, Amid R, Pourahmadie AD, Shidfar S. *In vitro* comparison of microbial leakage of the implant-healing abutment interface in four connection systems. *J Oral Implantol*. 2019 Aug 7. doi: 10.1563/aaaid-joi-D-18-00311. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31389766.

Tallarico M, Canullo L, Caneva M, Özcan M. Microbial colonization at the implant-abutment interface and its possible influence on periimplantitis: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthodont Res*. 2017 Jul; 61(3):233-41. doi: 10.1016/j.jpor.2017.03.001. Epub 2017 Mar 27. PubMed PMID: 28359872.

Tarnow DP, Cho SC, Wallace SS. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *J Periodontol*. 2000 Apr; 71(4):546-9. PubMed PMID: 10807116.

Tatarakis N, Bashutski J, Wang HL, Oh TJ. Early implant bone loss: preventable or inevitable? *Implant Dent*. 2012 Oct; 21(5):379-86. Review. PubMed PMID: 22983314.

Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an *in vitro* comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Jan-Feb;26(1):56-62. PubMed PMID: 21365038.

Tortora GJ, Funke BR, Christine L. *Case. Microbiologia*. 8.ed. São Paulo: Artmed; 2005.

Traversy MC, Birek P. Fluid and microbial leakage of implant-abutment assembly *in vitro* [abstract 1909]. *J Dent Res*. 1992; 71:754.

Tripodi D, Vantaggiato G, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G, D'Ercole S. An *in vitro* investigation concerning the bacterial leakage at implants with internal hexagon and Morse taper implant-abutment connections. *Implant Dent*. 2012 Aug; 21(4):335-9. doi: 10.1097/ID.0b013e31825cd472. PubMed PMID: 22814560.

Tsuruta K, Ayukawa Y, Matsuzaki T, Kihara M, Koyano K. The influence of implant-abutment connection on the screw loosening and microleakage. *Int J Implant Dent*. 2018 Apr 9; 4(1):11. doi: 10.1186/s40729-018-0121-y. PubMed PMID: 29629492; PubMed Central PMCID: PMC5890007.

Tsuge T, Hagiwara Y, Matsumura H. Marginal fit and microgaps of implant-abutment interface with internal anti-rotation configuration. *Dent Mater J*. 2008 Jan; 27(1):29-34. PubMed PMID: 18309609.

Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017 Feb 14; 12:1227-1249. doi: 10.2147/IJN.S121956. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28243086; PubMed Central PMCID: PMC5317269.

Wang L, Jin H, Ao X, Dong M, Liu S, Lu Y, Niu W. JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*. *Oral Dis*. 2019; 25(7):1769–1779. doi:10.1111/odi.13169

Wei L, Tang J, Zhang Z, Chen Y, Zhou G, Xi T. Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles *in vitro*. *Biomed Mater*. 2010 Aug;5(4):044103. doi: 10.1088/1748-6041/5/4/044103. Epub 2010 Aug 3. PubMed PMID 2068312

Yilmaz B, Alshahrani FA, Kale E, Johnston WM. Effect of feldspathic porcelain layering on the marginal fit of zirconia and titanium complete-arch fixed implant-supported frameworks. *J Prosthet Dent*. 2018; 120(1):71–78. doi:10.1016/j.prosdent.2017.11.003

Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ. Real-time probing of Membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*. 2004 Aug 17; 43(32):10400-13. PubMed PMID: 15301539.

Zanette C, Pelin M, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Laresse FF et al. Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicol In Vitro*. 2011 Aug;25(5):1053-60. doi: 10.1016/j.tiv.2011.04.005. Epub 2011 Apr 8. PubMed PMID: 21501681.

Zhang W, Wang S, Ge S, Chen J, Ji P. The relationship between substrate morphology and biological performances of nano-silver-loaded dopamine coatings on titanium surfaces. *R Soc Open Sci*. 2018 Apr 11; 5(4):172310. doi:10.1098/rsos.172310. eCollection 2018 Apr. PubMed PMID: 29765680; PubMed Central PMCID: PMC5936945.

Zhao G, Stevens SE Jr. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*. 1998 Jan; 11(1):27-32. PubMed PMID: 9450315.

Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011 Aug;32(24):5706-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.040. Epub 2011 May 12. PubMed PMID: 21565401.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*. 2006 Aug; 32(8):722-6. [Epub 2006 May 11]. PubMed PMID: 16861069.