

RESSALVA

Alertamos para ausência do
Capítulo 3. Proposição e do Apêndice A, não
incluídos pelo autor no arquivo original.

ROGÉRIO DE LIMA ROMEIRO

***ADERÊNCIA IN VITRO DE Streptococcus sanguinis E Candida albicans* EM IMPLANTES DENTÁRIOS DE SUPERFÍCIE LISA OU TRATADA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. José Luiz De Lorenzo

Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Faculdade de Odontologia de Guarulhos
Universidade de Guarulhos - UNG

Prof. Dr. Leonardo Marchini

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 14 de julho de 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo amor, incentivo e confiança que me fizeram seguir firme nesta difícil jornada.

À minha esposa Cláudia Mirtes Fonseca Romeiro pela paciência, amizade, amor, palavras de carinho e motivação e pelo apoio irrestrito que, inegavelmente fizeram parte desta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho. Projeto número 07/58198-0.

Ao meu orientador Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela orientação, amizade e paciência durante todo curso.

A Empresa De Bortoli – Ace na figura de seu presidente Nilton de Bortoli Junior pelo imenso apoio e por ceder 30 implantes para este experimento.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Às Profas. Dras. Cristiane Yumi Koga Ito, Juliana Campos Junqueira e Luciane Dias de Oliveira pelo convívio fraterno, pela amizade e dedicação.

Ao Funcionário Sérgio pela amizade e auxílios prestados durante o desenvolvimento do trabalho laboratorial.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Brison de Mattos pela execução dos trabalhos de microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas Cíntia, Cristiane, Flávio, Fernando, Graziela, Laura, Luis Felipe, Ney e Polyana pela amizade.

Aos colegas Leandro e Aline pelo companheirismo e dedicação.

*Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e
força para qualquer sociedade.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 <i>Streptococcus sanguinis</i>	13
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	15
2.3 <i>Candida albicans</i>	18
2.4 Superfícies dos implantes.....	21
2.5 Aderência de microrganismos à superfície dos implantes.....	24
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODO.....	33
4.1 Considerações éticas.....	33
4.2 Seleção dos implantes.....	33
4.3 Análises realizadas.....	34
4.3.1 Aderência na presença da saliva.....	36
4.3.2 Aderência na presença do plasma humano.....	36
4.4 Aderência dos microrganismos aos implantes.....	37
4.4.1 Aderência <i>in vitro</i> de <i>S. sanguinis</i>	39
4.4.2 Aderência <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i>	39
4.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura.....	40
4.6 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Aderência de <i>S. sanguinis</i>	42
5.2 Aderência de <i>C. albicans</i>	46
5.3 Aderência em Microscopia eletrônica de Varredura.....	49
6 DISCUSSÃO.....	60
7 CONCLUSÃO.....	60

8 REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE.....	82
ANEXOS.....	92
ABSTRACT.....	93

Romeiro RL. Aderência *in vitro* de *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* em implantes dentários de superfície lisa ou tratada [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar *in vitro* a aderência de *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans* e associações destes microrganismos com *Streptococcus mutans* às superfícies dos implantes dentários tratados com jateamento de fosfato de cálcio, anodização, duplo ataque ácido e os de superfície lisa, com ou sem a prévia incubação em saliva ou plasma sanguíneo. Foram selecionados 120 implantes, sendo 30 de cada superfície para cada microrganismo e associações estudadas. Para análise da aderência, foram preparadas suspensões de microrganismos contendo 10^6 células/ml em espectrofotômetro. Além disso, cada microrganismo e associações foram divididos em três grupos: em um, o implante foi removido da embalagem e colocado diretamente no caldo, em outro, foi previamente embebido em saliva humana por uma hora e no último em plasma humano, também por uma hora. Os implantes foram acondicionados separadamente em poços de placas de cultura de células contendo caldo sacarado (placa *in vitro*) e a suspensão do microrganismo. Após 24h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, os implantes foram lavados três vezes durante um minuto em solução salina estéril e colocados em sonicador com 10 ml de salina para dispersão das

células aderidas. A seguir, foram realizadas diluições seriadas e semeaduras em meios de cultura específico para cada microrganismo. Após 48h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), teste de tukey, com nível de significância de 5%. Para ilustrar a aderência dos microrganismos, foram selecionados o microrganismo *Streptococcus sanguinis*, e as associações *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* e *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram uma grande aderência dos microrganismos às superfícies estudadas, principalmente quando associados formando um biofilme. A superfície anodizada apresentou os menores valores de aderência dos dois microrganismos, nos três grupos e quatro superfícies estudadas. O microrganismo *S. sanguinis* apresentou maior aderência em implantes de superfície submetida ao duplo ataque ácido e *C. albicans* apresentou, maiores valores de UFC/ml nas superfícies jateadas. A presença de fluidos interpostos como saliva e plasma humanos não interferiram nesta aderência. A aderência de microrganismos aos implantes dentários parece ser dependente do tipo de tratamento da superfície.

Palavras-chave: Implante dentário. *Candida albicans*. *Streptococcus mutans*. *Streptococcus sanguinis*.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal humana é do ponto de vista ecológico, um sistema de crescimento aberto, ocorrendo transporte contínuo de microrganismos. Para sobreviver na cavidade bucal e causar infecção, os microrganismos precisam aderir-se às superfícies, ou então serão removidos pelo fluxo salivar. A boca apresenta condições ideais de crescimento para diversos microrganismos, possuindo muitos nichos que podem ser colonizados (Jendresen; Glantz, 1981; Nakazato et al., 1989).

A aderência de microrganismos às superfícies bucais rígidas como o esmalte dentário, material restaurador ou implante é um pré-requisito para a formação do biofilme, que pode, eventualmente, ocasionar cárie, doença periodontal ou periimplantite. A colonização bacteriana nas superfícies dentárias é sempre precedida pela aderência da película adquirida formada pela saliva ou fluido gengival. A composição do biofilme maduro é dependente de uma aderência primária entre bactérias pioneiras e película adquirida (Liljemark; Bloomquist, 1996; Walker; Sedlacek, 1999; Idone, 2003; Heuer et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado que tanto a qualidade quanto a quantidade do biofilme aderido, são importantes no sucesso em longo prazo, dos implantes dentais. A aderência inicial e a colonização de bactérias na superfície do implante são consideradas a chave da patogênese das infecções causadas pelas bactérias do biofilme (Lindhe et al., 1992; Ong et al., 1992; Jansson et al., 2005; Marcacci et al., 2008).

Atualmente trabalha-se em busca de uma superfície de implante ideal que permita perda mínima de tecido ósseo da crista marginal do implante. Sabe-se que um implante em condições adequadas, quando em função perde de 1 à 1,5 mm de crista óssea no

primeiro ano e 0,2 mm por ano nos anos subseqüentes (Albrektsson et al., 1986). Não se tem levado em consideração, entretanto, a maior susceptibilidade dessas superfícies em promover aderência bacteriana, facilitando a formação do biofilme dentário.

Streptococcus sanguinis (*S. sanguinis*) apresenta importância na formação inicial do biofilme dentário, pois constitui-se em importante componente da comunidade pioneira, apresentando mecanismos de aderência à superfície dos dentes (Caufield et al., 2000; Hauser-Gerspach et al., 2007). *Candida albicans* (*C. albicans*) é um fungo oportunista presente na cavidade bucal de vários indivíduos, que pode apresentar patogenicidade quando da presença de diversos fatores predisponentes (Alves et al., 2006; Jorge, 2007). Coagregação de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Candida albicans* na formação do biofilme dentário parece intensificar a aderência de ambos os microrganismos à superfície dentária e em materiais odontológicos (Arendorf; Walker, 1980; Branting et al., 1989; Holmes et al., 1995; Sen et al. 1997; Nikawa et al. 2003; Eick et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a aderência de *S. sanguinis* e *C. albicans* e associações desses microrganismos com *S. mutans* na superfície dos implantes após diferentes tratamentos e após prévia incubação em plasma e saliva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Streptococcus sanguinis*

Streptococcus sanguinis é um dos estreptococos predominantes que colonizam os dentes. Algumas amostras destas espécies têm cariogenicidade mínima para animais, mas a maioria não apresenta esta característica. As lesões de cárie produzidas por *S. sanguinis* ocorrem principalmente em sulcos e são significativamente menores que as produzidas por estreptococos do grupo mutans. *S. sanguinis* tem sido isolado em todos os biofilmes dentários examinados e também na língua, sendo dificilmente encontrado na garganta. Algumas cepas são alfa-hemolíticas, mas outras são beta e não hemolíticas. A maioria das amostras produz polissacarídeo extracelular glicano. Produzem ácido a partir da glicose, sacarose e trealose (Percival et al., 2006; Hauser-Gerspach et al., 2007).

S. sanguinis era denominado anteriormente de *S. sanguis* e as duas nomenclaturas são encontradas na literatura (Caufield et al., 2000; Razak; Rahim, 2003; Silva et al., 2005; Jorge, 2007). O microrganismo recebeu essa nomenclatura devido ao seu isolamento a partir de hemoculturas de pacientes com endocardite bacteriana subaguda.

S. sanguinis pode ser identificado por sua característica de fermentar manitol e sorbitol e sua capacidade de produzir amônia e dióxido de carbono a partir da arginina. As vias de hidrólise da arginina resultam na quebra da arginina em uréia, amônia e dióxido de carbono (Kawashima et al., 2003; Percival et al., 2006). Este fornece energia para

o crescimento bacteriano na ausência de carboidratos fermentáveis permitindo ao *S. sanguinis* sobreviver no biofilme dentário. Entretanto, a amônia produzida pode neutralizar os ácidos provenientes da fermentação de bactérias, tornando o ambiente mais adequado ao seu crescimento. Sugere-se que este fator seja a razão do *S. sanguinis* apresentar menor potencial cariogênico que muitas cepas de *S. mutans*, os quais não apresentam esta via (Hauser-Gerspach et al., 2007). Outra propriedade de interesse do *S. sanguinis* é a produção de dextranas. Este polímero da glicose, semelhante aos polímeros da frutose são produzidos enzimaticamente a partir da sacarose pela ação da glicosiltransferase. Tais enzimas estão associadas com a superfície desses microrganismos, embora sua maneira exata de ligação a parede celular seja ainda desconhecida. A solubilidade na água da dextrana torna sua contribuição no processo de ligação questionável; contudo, as enzimas de *S. sanguinis* podem ligar-se a dextranas menos solúveis produzidas por *S. mutans*, propiciando uma forma de fixação deste microrganismo mais cariogênico ao biofilme dentário. Embora mais cariogênicas, estas espécies apresentam uma menor capacidade de aderência a superfície dentária que *S. sanguinis* (Wolinsky et al., 1989).

Apesar de classicamente ter sido constatado que os estreptococos possuem vias indiretas para o oxigênio, está claro que algumas espécies produzem pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio. Como tais microrganismos não apresentam catalases ou peroxidases, ocorre um acúmulo de peróxido que pode se tornar tóxico. Esta é uma razão da incubação anaeróbia ser frequentemente utilizada para a cultura destes microrganismos. As células de *S. sanguinis* apresentam-se em formas bacilares pleomórficas quando são crescidos em frascos que permitam que a superfície seja exposta ao ar e ocorra absorção de oxigênio. A viabilidade dessas formas bacilares é pequena quando comparadas com as formas cocóides usuais. O peróxido não é

apenas autotóxico, mas também inibe o crescimento de outros microrganismos. Isto pode explicar o fato da presença de *S. sanguinis* no biofilme dentário ser sugerida como benéfica (Silva et al., 2005).

2.2 *Streptococcus mutans*

Os estreptococos do grupo mutans são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dentária, principalmente as espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Pin et al., 2005). A colonização na cavidade bucal por estes microrganismos depende de superfícies duras, não-descamativas. *S. mutans* são anaeróbios facultativos, residentes da boca e apresentam característica de possuir potencial cariogênico devido à sua capacidade acidogênica e acidúrica, favorecendo a formação de biofilme dentário e produzindo polissacarídeos, permitindo produção de ácido, mesmo na ausência de fontes exógenas de sacarose (Daley; Gibson, 1990; Featherstone, 1996; Jorge, 2007).

Ao contrário de muitos outros estreptococos bucais que fermentam apenas pequena quantidade de carboidratos, *S. mutans* fermenta diversos açúcares. Em particular, o manitol e o sorbitol, açúcares alcoólicos derivados da manose e da glicose, respectivamente, permitem diferenciá-lo dos demais estreptococos bucais. A definição de *S. mutans* seria estreptococos α -hemolíticos, que fermentam manitol e sorbitol e não hidrolisam arginina. Além da fermentação de uma ampla variedade de açúcares, esses microrganismos apresentam diferenças quantitativas nos ácidos produzidos a partir da glicose (Curtiss, 1986). *S. mutans* acumula grande quantidade de ácido e provoca maior queda no pH que as cepas de *S. sanguinis* (Gibbons; Nygaard, 1968).

S. mutans produz a enzima glicosiltransferase e o principal carboidrato produzido é a dextrana (glicanas). Este polímero é muito menos solúvel e possui propriedades tão distintas das glicanas comuns que recebeu uma nomenclatura específica: mutano. Este é relativamente insolúvel e sua presença na superfície bacteriana a torna com aspecto “pegajoso” tal que uma bactéria não consegue se separar da outra com facilidade. Por isso acredita-se que essa propriedade seja importante na aderência deste microrganismo às superfícies (Curtiss, 1986; Nikawa et al., 1998).

A superfície celular de *S. mutans* possui antígenos protéicos e glicosiltransferases, cuja ação cooperativa é essencial para a adesão dependente de sacarose. Por outro lado, o antígeno protéico parece estar correlacionado à habilidade de *S. mutans* de aderir às estruturas dentais independente de sacarose. Os fatores de virulência de *S. mutans* e *S. sobrinus* incluem adesão, ácido-resistência e ácido-tolerância. Existem diversos genótipos de *S. mutans* com elevada virulência (Pin et al., 2005).

A aderência de *S. mutans* às superfícies dentárias ou em materiais restauradores ocorre em quatro fases: a) transporte das bactérias em direção à superfície; b) adesão inicial mediada por forças de curta e longa distância (forças de Van der Waals e eletrostáticas); c) adesão mediada por interações específicas; e, d) colonização. A adesão inicial mediada por forças de curta distância é fraca e não permite verdadeira colonização, sendo os microrganismos facilmente removidos por mecanismos de controle e regulação da microbiota bucal. No entanto, a adesão bacteriana mediada por interações específicas permite ancoragem mais forte entre as bactérias e superfície. Isto ocorre pelo contato direto ou por verdadeiras pontes, como os apêndices filamentosos extracelulares entre microrganismos e superfícies. As ligações específicas são mediadas por componentes protéicos extracelulares específicos

(adesinas), presentes na parede celular das bactérias e receptores complementares sobre estas superfícies (Quirynen; Bollen, 1995).

Embora a literatura considere que a adesão bacteriana apresenta uma fase inespecífica, mediada pela ação de forças, e outra fase específica, mediada pela expressão das adesinas, deve-se considerar que um microrganismo colonizando inicialmente uma superfície precisa interagir, por meio de forças inespecíficas, para explorar as características químicas da superfície e então, desenvolver adesinas específicas ao material (Candido et al., 2000).

Quando *S. mutans* entra em contato com glicoproteínas salivares que cobrem a superfície dentária ou de materiais restauradores, dois estágios de aderência ocorrem, seguidos do imediato crescimento do biofilme dentário. O primeiro estágio é reversível e dependente de sacarose, envolvendo interações iônicas e de lectinas, entre antígenos da superfície bacteriana, como a proteína P1 e fatores derivados do hospedeiro na película adquirida. Quando a sacarose proveniente da dieta torna-se disponível na cavidade bucal, glicosiltransferases passam a mediar à aderência de *S. mutans* à superfície dentária ou de materiais restauradores por meio da síntese de glucanos solúveis e insolúveis. Os fatores que mediam a expressão dos mediadores que contribuem na formação dos glucanos e das glicosiltransferases ainda não foram totalmente esclarecidos (Idone et al., 2003).

S. mutans também produz frutossiltransferases, enzimas que sintetizam polímeros de frutanos a partir de sacarose, que podem servir de reservatórios de carboidratos extracelulares para serem metabolizados nos períodos de baixa disponibilidade de açúcares (Gibbons; Nygaard, 1968; Gibbons, 1989). Segundo Rozen et al. (2004) as enzimas de frutossiltransferases não ligadas às células, e que estão livres na saliva, podem apresentar sítios de ligação específicos para glicanos. Estes podem estar presentes na superfície de *S. mutans*, bem como podem estar adsorvidos nas superfícies sólidas no ambiente bucal.

Assim, frutotransferases podem aumentar a retenção de *S. mutans* às superfícies por formar uma ponte de ligação. Desta forma, glicanos e frutanos podem ser parte integral da matriz de polissacarídeos dos biofilmes bucais.

2.3 *Candida albicans*

Candida albicans é a principal espécie do gênero associada à candidose (Nikawa et al., 2003; Migliorati et al., 2004). Apresenta duas formas de crescimento: levedura e hifa. Na forma de levedura apresenta-se como células globosas, Gram-positivas, ovaladas ou alongadas medindo em média 3 a 7 µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento

Quando na forma de micélio, apresenta-se como pseudohifas ou hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras. Fermenta glicose e maltose, não ocorrendo o mesmo com a lactose; geralmente não fermenta sacarose e a fermentação da galactose é variável. Como fontes de carbono assimilam dextrose, galactose, maltose, trealose, xilose, sacarose e manitol; eventualmente arabinose, ribose e glucitol. É um microrganismo aeróbio, no entanto, é capaz de crescer em anaerobiose (Henriques et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Jorge, 2007).

O conhecimento da ecologia das leveduras revela que diversas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis e que estão amplamente distribuídas no meio ambiente, na fauna e na flora, no solo e na água (Lacaz, 2002). Leveduras do gênero *Candida*, são normalmente isoladas da cavidade oral humana (Stenderup, 1990).

C. albicans não está distribuída uniformemente na boca; o dorso da língua parece ser o reservatório primário do fungo, a partir do

qual o restante da mucosa, superfícies dos dentes, biofilme dentário e saliva tornam-se colonizados secundariamente. Ainda não está claro porque alguns indivíduos são portadores de *C. albicans* e outros não, entretanto, fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e presença de anticorpos específicos na saliva parecem ser relevantes. O estado de portador ocorre em maior número em indivíduos do tipo sanguíneo O e em não secretores de antígenos dos grupos sanguíneos na saliva. A superfície acrílica da prótese total predispõe o aumento do número de *C. albicans*, visto que o fungo cresce e coloniza mais intensamente a superfície da prótese que a mucosa palatina. Outros tipos de materiais como próteses, aparelhos ortodônticos e implantes também facilitam o desenvolvimento de *C. albicans* na boca (Sullivan et al., 2004; Jorge, 2007; Oliveira et al., 2007; Pereira et al., 2007).

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade oral de 3 a 48% de adultos e 45 a 65% das crianças saudáveis. *C. albicans* possui potencial patogênico bastante conhecido. Apresenta como principais fatores de patogenicidade a capacidade de aderência a mucosas e superfícies inanimadas, como acrílico; dimorfismo como produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tecidual; termotolerância significativa; e produção de enzimas como proteinases e fosfolipases. A fase hifal apresenta aderência maior às células do organismo em relação à fase de levedura. A capacidade de aderência à mucosa bucal ocorre pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores das células epiteliais (Webb et al., 1998).

Dentre os fatores de virulência, a produção de enzimas tem obtido atenção. A proteinase é capaz de degradar vários substratos como queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular (Niewerth; Kortling, 2001). Já as fosfolipases agem clivando os fosfolipídios. Além disso, parecem estar relacionadas com a produção do tubo germinativo, transição para a forma hifal e injúria tecidual (Wu-Yuan et al., 1995).

A candidose, uma das principais infecções fúngicas oportunistas do ser humano, é provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota residente do organismo humano. Essa infecção expressa bem a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal (Ghannoum, 2000; Migliorati et al., 2004).

Migliorati et al. (2004) demonstraram que amostras de *Candida* isoladas de pacientes infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com candidose orofaríngea apresentaram 52,2% das cepas de *C. albicans* resistentes ao cetoconazol, 30,4% ao fluconazol e 26% ao itraconazol.

Estudos epidemiológicos mostraram que *C. albicans* é a mais prevalente em todo o mundo e está principalmente associada com candidose orofaríngea em pacientes infectados pelo HIV, embora infecções bucais por essa espécie também tenham sido observadas em indivíduos saudáveis (Stenderup, 1990).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos para quantificar e caracterizar a aderência dessas leveduras em superfícies celulares e superfícies inanimadas, tais como resinas acrílicas e implantes dentários (Pires et al., 2001). Segal et al. (1997) também observaram que diferentes espécies de *Candida* aderiram às superfícies acrílicas, sendo *C. albicans* a espécie que apresentou maior aderência, seguido por *Candida tropicalis* e *Candida stellatoidea*, *Candida parapsilosis* apresentou aderência mais moderada.

2.4 Superfícies dos implantes

Os implantes dentários são confeccionados em titânio comercialmente puro que é uma liga que possui em sua composição 99% do metal titânio. O titânio, quando em contato com o oxigênio forma uma camada de óxido (TiO_2) que é inerte e permite a osseointegração (Adell et al. 1981; Albrektsson et al. 1986; Albrektsson; Wennerberg, 2004). Atualmente, a superfícies do implante, que se apresentava totalmente polida, sofre alguns tipos de tratamentos para aumentar a sua rugosidade e, conseqüentemente, sua superfície de contato, aumentando assim a osseointegração. Existem vários tipos de tratamento de superfície disponíveis no mercado internacional. Algumas das superfícies mais utilizadas são: a) anodizada; b) duplo ataque ácido; e, c) jateamento com cerâmica de fosfato de cálcio.

A superfície de implante anodizada é produzida por oxidação eletrolítica. A superfície possui uma fina camada de óxido e uma rugosidade discreta. É um processo eletroquímico que aumenta a camada superficial de TiO_2 . O implante é imerso em uma solução eletrolítica e se torna um anodo em uma célula eletroquímica. Quando o potencial é aplicado na amostra, carga iônica é transferida para a célula e uma reação eletrolítica acontece, resultando no crescimento da camada de óxido. Foi introduzida no mercado em 2001 e existem inúmeros trabalhos na literatura comprovando sua efetividade em aumentar o contato osso-implante (Henry et al., 2000; Sennerby; Miyamoto, 2000). Essa superfície apresenta uma fina camada de óxido na porção mais coronal do implante e uma grande rugosidade na região mais apical. Ela é utilizada com uma vasta combinação de desenhos de implantes (Albrektson, Wennerberg, 2004).

Rocci et al. (2002) realizaram análise histológica de implantes com superfície anodizada submetidos a carga imediata na

região posterior de mandíbula. Esta superfície demonstrou uma média de 93,3% de contato osso-implante.

A superfície tratada por duplo ataque ácido recebe tratamento por duplo condicionamento ácido, usando ácido clorídrico e sulfúrico (Al-Nawas et al., 2007). Lazzara et al. (1999) analisaram histologicamente mini-implantes de superfície tratada com duplo ataque ácido colocados na região posterior de maxila por seis meses comparados a implantes lisos colocados na mesma arcada porém no lado oposto. Após a análise dos resultados foi verificada maior porcentagem de osseointegração nos implantes que receberam o tratamento da superfície.

Khang et al. (2001) relataram um índice de sucesso do implante tratado com duplo ataque ácido de 98,4% em osso de boa qualidade (predominantemente cortical) e 98,1% em osso de qualidade inferior (predominantemente medular). O elevado índice de sucesso foi atribuído ao aumento da superfície de contato proporcionada pelo tratamento de superfície.

Comparando a osseointegração em implantes lisos e que sofreram tratamento por duplo ataque ácido, Weng et al. (2003), utilizando cães, concluíram que, em osso de pobre qualidade, o contato osso implante foi significativamente maior nos implantes de superfície tratada.

Aalam e Nowzari (2005) realizaram uma avaliação clínica e radiográfica de implantes com superfície lisa, anodizada e que receberam duplo ataque ácido. Foram instalados 198 implantes, todos foram considerados de sucesso clínico e radiográfico. Não foram detectados, sinais de mobilidade, infecção ou inflamação.

Pongnarisorn et al. (2007) analisaram a diferença no infiltrado inflamatório associado a implantes de superfície submetida a ataque ácido (A), superfície preparada por anodização (D), liso com ranhuras (C) e liso (B). Os implantes foram instalados e seis meses após foi realizada análise do biofilme e biópsia do tecido periimplantar. Técnica de imunohistoquímica foi utilizada para avaliar as características do

infiltrado e PCR para avaliação da presença de periodontopatógenos. Infiltrado inflamatório estava associado a todas as superfícies. Todos os implantes apresentavam similar número de *Tannerella forshytia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em nenhuma amostra. Os resultados mostraram que a presença de inflamação e de infiltrado inflamatório independe da superfície dos implantes.

Existem ainda os implantes que recebem tratamento por jateamento cerâmico com fosfato de cálcio na superfície. Este método promove uma textura superficial com cerâmica de fosfato de cálcio que é passivado com ataque ácido para remoção as partículas residuais (Cochran et al., 1994).

Gonshor et al. (2003) avaliaram 1077 implantes com superfície tratada com jateamento cerâmico colocados em 348 pacientes sendo 950 na mandíbula e 127 na maxila. Em 91,1% dos casos foram colocados implantes de 3,75 ou 4 mm de diâmetro. A taxa de sucesso após 50 meses foi de 99,3% na mandíbula e 100% na maxila. Não houve perda significativa de crista óssea.

Won et al. (2003) realizaram trabalho comparando o torque de remoção de implantes lisos comparados com implantes tratados com jateamento cerâmico. Foi verificado um maior torque necessário para a remoção de implantes com este tratamento, comparado aos implantes lisos.

Nos implantes de superfície tratada com jateamento cerâmico e duplo ataque ácido as primeiras roscas do implante não recebem tratamento, para evitar maior aderência dos microrganismos e, conseqüentemente, prevenir periimplantite (Davies, 1998).

2.5 Aderência de microrganismos à superfície dos implantes

A aderência bacteriana às superfícies sólidas nas cavidades bucais é inicialmente mediada por forças de Van der Waals e eletrostáticas, e por serem fracas não permitem verdadeira colonização, sendo que os microrganismos podem ser facilmente removidos pelos mecanismos de regulação e controle da microbiota bucal (Gibbons et al., 1989; Bussher; Van der Mei, 1997). Para possibilitar a colonização bacteriana nas superfícies, ocorre à aderência mediada por interações específicas, promovendo ancoragem mais forte entre microrganismos e superfícies por meio de contato direto ou por verdadeiras pontes, como apêndices filamentosos extracelulares. Neste ambiente, o líquido (saliva) presente entre as superfícies que interagem deve ser removido. Pode-se considerar que esta remoção de líquido entre as superfícies aderentes seja o mecanismo pelo qual a hidrofobicidade da superfície celular e a hidrofobicidade da superfície sólida influenciam o processo de aderência (Nassar et al., 1995).

As interações específicas entre bactérias e superfícies são mediadas por componentes protéicos extracelulares específicos presentes na parede celular das bactérias e receptores complementares sobre as superfícies (Curtiss, 1986; Gibbons et al., 1989).

Entre as proteínas salivares identificadas como sítios complementares, são importantes a IgA secretora, mucina e proteínas ricas em prolina. Algumas bactérias reconhecem estas proteínas como receptores específicos somente quando adsorvidas às superfícies (Jendresen; Glantz, 1981).

Diversos genes que promovem a expressão de adesinas têm sido identificados em *Streptococcus*. Adesinas constituem-se em proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas e polissacarídeos e estão

frequentemente associadas com a presença de fímbrias na superfície celular (Gibbons et al., 1989).

De acordo com Listgarten (1994), as primeiras bactérias que colonizam as superfícies sólidas no ambiente bucal formando o biofilme são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e bacilos curtos, principalmente espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces*. Cocos anaeróbios Gram-negativos, como *Veillonella*, também podem ser observados. Durante o primeiro dia, a superfície é gradualmente coberta por agregados de bactérias que estão se multiplicando e expandindo-se lateralmente. Por volta do terceiro dia, bactérias filamentosas podem ser visualizadas sobre a superfície do biofilme predominantemente formado por cocos. Em uma semana, colônias de cocos ainda predominam. Com o decorrer do tempo, bactérias filamentosas começam a aumentar no biofilme, substituindo gradualmente o predomínio de cocos por filamentosos. Com tudo, a estrutura do biofilme pode variar de acordo com a condição clínica do paciente.

Durante os eventos iniciais da formação do biofilme, observou-se o agrupamento das moléculas das proteínas salivares que ocorre sobre uma superfície sólida durante a formação da película adquirida parece variar conforme o tipo de superfície. Assim, esta disposição do agrupamento de moléculas parece variar entre os materiais. O resultado final é que a composição e retenção de ambos, película adquirida e biofilme pode ser diferente de material para material. A energia superficial livre da superfície sólida parece ser a propriedade determinante nas características da película adquirida adsorvida (Jendresen; Glantz, 1981; Nassar et al., 1995; Tamesada et al., 2004).

Consequentemente torna-se importante, na Implantodontia, conhecermos o mecanismo de aderência dos microrganismos as diversas superfícies de implantes, para que possamos não apenas conhecer seus efeitos benéficos à osseointegração, como

também suas ações deletérias ao tecido periimplantar (Romeiro et al., 2009).

Estudos das características das superfícies e formação de biofilme, *in vitro*, têm sido realizados para verificar a aderência bacteriana em superfícies como materiais restauradores e hidroxiapatita, mas poucos avaliam a aderência desses microrganismos à superfície dos implantes (Fujioka-Hirai et al., 1987; Sipahi et al., 2001).

Diferentes superfícies de implantes podem promover aderência seletiva durante a formação do biofilme inicial (Ruona; Maxson, 1991; Rasperini et al., 1998). A aderência de células bacterianas à superfície de implantes é diretamente proporcional à rugosidade de sua superfície. Com o aumento da rugosidade ocorre aumento exponencial de bactérias aderidas (Silva et al., 2005). Nos tecidos intra-orais, *Actinomyces* e estreptococos são considerados os primeiros colonizadores, preparando o ambiente para colonizadores tardios que requerem diferentes condições de crescimento. Muitas dessas bactérias como *Fusobacterium*, *Capnocytophaga* e *Prevotella*, aderem-se aos estreptococos presentes no biofilme e posteriormente podem atuar em infecções periodontais e periimplantares. O desenvolvimento de implantes com superfícies que reduzam o número inicial de bactérias aderidas minimizando a formação do biofilme, e conseqüentemente a inflamação nos tecidos moles da boca, é importante, pois o acúmulo de biofilme ao redor dos implantes pode causar reação inflamatória e conseqüente falha no implante (Mombelli et al., 1987; Mombelli, 1993; Mombelli; Lang, 1998).

Implantes dentários têm obtido sucesso por muitos anos, entretanto, é de consenso que a presença de bactérias com potencial patogênico está relacionada com o seu insucesso. Estudos comprovaram que a periimplantite possui uma etiologia semelhante ao da doença periodontal (Rams et al., 1984; Ong et al., 1992; Mombelli, 1993; Mombelli; Lang, 1998; Persson et al., 2006). A correlação entre o maior

acúmulo de biofilme, presença de periodontopatógeno e o aumento do nível de perda óssea ao redor do tecido periimplantar tem sido relatada (Newman; Flemming, 1988).

Wolinsky et al. (1989) examinaram a aderência inicial, *in vitro*, de *S. sanguinis* (G9-B) e *Actinomyces viscosus* (T14V) nas superfícies do titânio e esmalte dentário imersos em soro fisiológico (NaCl 0,9%). Houve menor aderência de *A. viscosus* ao titânio quando comparado ao esmalte. A aderência de *S. sanguinis* ao titânio não variou em relação ao esmalte dentário. A comparação da porcentagem de células aderidas ao titânio revelou que *S. sanguinis* aderiram-se em números mais altos que *A. viscosus*.

Gatewood et al. (1993) analisaram por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a maturação do biofilme supragengival do esmalte e titânio de superfície lisa, e o subgengival do cimento e implantes de superfície tratada com plasma spray de titânio e com hidroxiapatita. Foram obtidas amostras dos três tipos de implante medindo 6,5 X 2 X 1 mm. Foram seccionados terceiros molares inclusos com quantidades similares de esmalte e cimento e diâmetro semelhante ao dos implantes. Foram selecionados 10 pacientes com bolsas periodontais maiores que 6 mm em três dentes adjacentes. As amostras foram instaladas na região subgengival (cimento e superfície tratada) e supragengival (superfície lisa e esmalte). Os pacientes foram instruídos a pararem com a higiene oral. As amostras foram removidas em 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Duas amostras de cada foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura. A sequência de aparecimento dos diversos morfotipos nas amostras sub ou supragengivais nas diversas superfícies foram semelhantes. Os resultados indicaram que tanto a superfície do dente natural, como a dos implantes de superfície lisa, tratada com plasma spray de titânio e hidroxiapatita promovem a formação de biofilme maduro e com espécies variadas de microrganismos.

Wu-Yuan et al. (1995) estudaram a aderência de *S.*

sanguinis, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis* em discos de titânio com diferentes superfícies (lisa, riscada e rugosa) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A maior aderência foi encontrada no titânio de superfície rugosa. A superfície lisa promoveu pobre aderência de *S. sanguinis* e *A. viscosus*. Entretanto, *P. gingivalis* apresentou resultados de aderência semelhantes em todas as superfícies.

Okte et al. (1999) analisaram a aderência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em implantes de titânio. O estudo incluiu três amostras de diferentes sorotipos, a, b e c e duas amostras clínicas, sorotipos d e e. Para cada amostra, suspensões bacterianas com concentração de 5×10^7 células/ml foram preparadas e 0,5 ml de cada foram adicionadas a superfície dos implantes. Após a incubação a 37°C por 60 min em atmosfera com 5% de CO₂, os implantes com as bactérias foram preparados para a visualização em microscopia eletrônica de varredura. A adesão bacteriana foi quantificada na superfície dos implantes e os resultados foram analisados estatisticamente. Os resultados demonstraram que as amostras de *A. actinomycetemcomitans* aderiram em diferentes quantidades à superfície dos implantes. O sorotipo a mostrou maior aderência, b, c e d mostraram o mesmo grau de aderência e o sorotipo e foi o que apresentou menor capacidade de aderência.

Grössner-Schreiber et al. (2001) estudaram a formação do biofilme dentário em implantes de superfície tratada. Foram utilizados *S. sanguinis* e *S. mutans* e discos de titânio puro e modificado por quatro tratamentos de superfície, deposição física de vapor com nitrato de titânio ou nitrato de zircônia, oxidação térmica e laser. Uma redução significativa na aderência bacteriana foi observada nos discos tratados com nitrato de titânio, zircônia e oxidação térmica, comparados com o implante polido. Os autores concluíram de que alguns tratamentos de superfície diminuíram a colonização de bactérias formadoras do biofilme dentário.

Em trabalho semelhante, Grössner-Schreiber et al. (2004)

avaliaram *in vivo* a composição do biofilme dentário em implantes tratados com nitrato de zircônia e nitrato de titânio. Finas membranas de vidro cobertas com nitrato de titânio, nitrato de zircônia e titânio puro foram montadas em aparelhos intra-bucais removíveis e foram colocados em dois indivíduos adultos. Após 60 h de exposição ao meio intra-oral, foram analisados a composição e quantidade de microrganismos do biofilme. Os resultados demonstraram a maior concentração de bactérias na superfície de titânio puro.

Sardin et al. (2004) analisaram a aderência *in vitro* de estreptococos em implantes e amostras de esmalte após serem tratados com saliva e investigaram a influência da energia livre de superfície (SLE), bem como as características adesivas das bactérias. Menor colonização foi observada na amostra de esmalte e o menor valor de aderência bacteriana está relacionado à tensão hidrofílica bacteriana. Quando foi relacionado o número de bactérias aderidas e as propriedades da superfície das bactérias, concluiu-se que a aderência bacteriana foi influenciada por um componente não polar do substrato. Esses resultados são condizentes com a teoria termodinâmica e enfatizam a importância das características ácido-básicas da superfície celular na aderência de bactérias às superfícies de dentes ou implantes.

Em 2007, Hauser-Gerspach et al. analisaram a aderência de *Streptococcus sanguinis* em esmalte, implantes dentários e materiais restauradores durante uma hora, utilizando uma câmara de fluxo que mimetizava *in vitro* a cavidade oral. Os materiais utilizados foram: titânio, ouro, cerâmica e resina. O número de bactérias aderidas foi alto no titânio e ouro, e baixo na resina e no esmalte. Os resultados sugeriram que as variações na quantidade de adesão de *S. sanguinis* neste modelo *in vitro*, dependem da superfície restauradora avaliada.

Marcacci et al. (2008) avaliaram a aderência de *Candida albicans* em ligas de titânio e cobalto-cromo, com diferentes desgastes. Foram confeccionados 24 corpos-de-prova (CP) cilíndricos, 12 de titânio e

12 de cobalto-cromo, divididos em quatro grupos de seis. Todos foram polidos de forma habitual pelo mesmo técnico. Os CP foram lixados em torno de alta rotação por 15 segundos cada lixa, por toda a sua superfície. Um grupo de cada metal foi lixado apenas com lixa para metal número 80. Os dois outros grupos foram lixados conforme a seqüência (granulação decrescente): 80, 150 e 220. Os CP foram esterilizados e posicionados em placas de cultura de células. Em cada poço da placa foi adicionada quantidade padronizada de caldo Sabouraud e suspensão contendo 10^6 cels/ml de *C. albicans* (ATCC 18804). Após incubação, o número de células aderidas por mm^2 foi obtido pelo método de semeadura em placa de Petri contendo meios de cultura. Os valores encontrados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. Houve diferença estatística para a granulação de lixas, e não houve diferença quando foram comparados os metais. Os autores concluíram que quanto maior é a granulação final da lixa maior é a aderência, e o tipo de metal não influenciou no resultado.

Romeiro et al. (2009) analisaram *in vitro* a aderência de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida glabrata* aos implantes tratados com jateamento de óxido de titânio e aos implantes de superfície lisa. Foram utilizados 10 implantes de superfície tratada e 10 implantes de superfície lisa para cada microrganismo estudado. Para análise da aderência, foram preparadas suspensões de *Candida* contendo 10^6 células viáveis/ml em espectrofotômetro. Os implantes foram acondicionados separadamente em tubos cônicos (falcon) contendo caldo Sabouraud e a suspensão do microrganismo. Após 24 h de incubação a 37°C , os implantes foram lavados e colocados em sonicador com solução fisiológica para dispersão das células aderidas. A seguir, foram realizadas diluições seriadas e culturas em ágar Sabouraud dextrose. Após 48h a 37°C , foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e os dados submetidos ao teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). *C. albicans* apresentou maior aderência aos implantes seguida por *C.*

glabrata e *C. dubliniensis*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os implantes tratados e lisos para todas as espécies estudadas. Concluiu-se que a aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* aos implantes tratados com jateamento de óxido de titânio foi semelhante ao implante de superfície lisa.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a aderência *in vitro* de *Streptococcus sanguinis* e *Candida albicans* em implantes dentários de superfície lisa e que receberam tratamento por anodização, duplo ataque ácido e jateamento com cerâmica de fosfato de cálcio. Foram também avaliadas as associações dos microrganismos com *Streptococcus mutans* e a influência da saliva e do plasma humanos, nesta aderência.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sob o protocolo nº 05/2008-PH/CEP (Anexo A).

4.2 Seleção dos implantes

Para realização do experimento foram selecionados 120 implantes de titânio comercialmente puro:

- 30 implantes de superfície lisa (ACE® - Brockton, EUA) medindo 3,3 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento, de hexágono externo com os tapa implantes instalados;

- 30 implantes de superfície anodizada (TiUnite – NOBEL BIO CARE® - Gotemburgo, Suécia) medindo 3,3 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento, de hexágono externo com os tapa implantes instalados;

- 30 implantes de superfície jateada com cerâmica de fosfato de cálcio (RBM – Resorbable Blast Media - ACE® - Brockton, EUA) medindo 3,3 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento, de hexágono externo com os tapa implantes instalados;

-30 implantes de superfície submetida ao duplo ataque ácido (Osseotite – 3i® - Palm Beach Gardem, EUA) de 3,25 mm de diâmetro por 10 mm de comprimento, também de hexágono externo com os tapa implantes instalados.

Os implantes foram esterilizados por autoclavação (121 °C, 15 min), antes dos ensaios de aderência para cada microrganismo ou associações dos mesmos.

4.3 Análises realizadas

Foram utilizadas amostras padrão de *S. sanguinis* (ATCC10556) e *C. albicans* (ATCC18804) e realizadas análises dos microrganismos separadamente e quatro associações dos mesmos, incluindo associação com *S. mutans* (ATCC 35688) (Quadro 1).

Os implantes foram separados em 3 grupos. No primeiro grupo (controle), os implantes foram, imediatamente depois de removidos da embalagem estéril, transferidos assepticamente para poços de placas de cultura de células (Costar® - Uberlândia, Brasil). No segundo grupo, antes da realização da prova de aderência, os implantes foram tratados com saliva humana por 1 hora, e no terceiro os espécimes foram mantidos em plasma humano, também por 1 hora (Quadro 2).

Quadro 1 - Microrganismos e associações dos mesmos e número de implantes de acordo com os grupos e tratamentos realizados. Foi utilizado n=10 para cada ensaio (controle, com saliva e com plasma)

Microrganismos e Associações	Número de ensaios				
	Lisa	Cerâmica	Anodizada	Ataque ácido	Total
<i>S. sanguinis</i>	30	30	30	30	120
<i>C. albicans</i>	30	30	30	30	120
<i>S. sanguinis</i> e <i>S. mutans</i>	30	30	30	30	120
<i>S. sanguinis</i> e <i>C. albicans</i>	30	30	30	30	120
<i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i>	30	30	30	30	120
<i>S. sanguinis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>S. mutans</i>	30	30	30	30	120
Total de ensaios	180	180	180	180	720

Quadro 2 - Distribuição do número de implantes pelos grupos e tratamentos realizados, para cada microrganismo

Grupo	Número de implantes			
	Lisa	Cerâmica	Anodizada	Ataque ácido
Controle	10	10	10	10
Saliva humana	10	10	10	10
Plasma humano	10	10	10	10
Total	30	30	30	30

4.3.1 Aderência na presença da saliva

Saliva humana estimulada foi coletada de um grupo de seis indivíduos, de ambos os sexos. Os doadores apresentavam saúde sistêmica e bucal, não apresentavam lesões ativas de cárie e doença periodontal segundo critérios de López et al. (2002) e não eram tabagistas. Ainda apresentavam baixo índice de placa (índice de O`Leary igual ou inferior a 20%) e número de estreptococos do grupo mutans inferior a 10^6 UFC/ml de saliva. Imediatamente após a coleta, a saliva foi agrupada e inibidor de protease PMSF (fenil metil sulfonil fluoridro) e azida sódica foram adicionados (20 µl de PMSF e de azida sódica para cada 1 ml de saliva). A seguir, a saliva foi centrifugada por 20 min a 4 °C a 20000 RPM (MPW-350R, Biosystems - São José dos Pinhais, Brasil) para remover debris e congelada até o momento do experimento. Antes do uso, a saliva foi filtrada à vácuo em membrana de éster celulose com poros de 0,45 µm de diâmetro (Milipore, São Paulo, SP, Brasil).

Os implantes foram totalmente imersos na saliva filtrada por 60 min a 37 °C e então lavados em água destilada esterilizada para imediatamente serem submetidos aos testes de aderência.

4.3.2 Aderência na presença do plasma humano

Plasma humano do banco de sangue do Hospital Universitário da Universidade de Taubaté (UNITAU) foi congelado até o momento da utilização.

Os implantes foram totalmente imersos no plasma por 60 min a 37 °C e então lavados em água destilada esterilizada para também serem submetidos aos testes de aderência.

4.4 Aderência dos microrganismos aos implantes

Os microrganismos foram semeados em placas de Petri contendo ágar específico para o microrganismo e incubados a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h. A partir do crescimento, foram preparadas suspensões padronizadas dos microrganismos contendo 10⁶ células/ml, por análise em espectrofotometria (Espectrofotômetro B-582 - Micronal 3.0.4 -São Paulo, Brasil).

Os implantes foram colocados individualmente em poços de placas de cultura de células (Costar® - Uberlândia, Brasil) contendo 2,0 ml de caldo para placa *in vitro* (Gybbons; Nygaard, 1968) e 0,1 ml da suspensão padronizada com o microrganismo. As placas de cultura de células foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 h a 5% de CO₂, em incubadora de CO₂. A seguir, os implantes foram removidos e lavados durante um minuto por três vezes em solução fisiológica esterilizada para retirada das células bacterianas ou fúngicas não aderidas e transferidos para tubos Falcon contendo 10 ml de solução fisiológica (NaCl 0,85%) esterilizada e submetidos ao homogeneizador ultra-sônico (Sonicador Bandelin Sonoplus) utilizando-se potência de 50 W por 30 segundos, para retirar as células microbianas aderidas. A suspensão inicial obtida foi diluída 100 e 1000 vezes e uma alíquota de 0,1 ml foi transferida, em duplicata, para placas contendo ágar apropriado para o crescimento de cada microrganismo.

Quando da associação dos microrganismos, os implantes foram transferidos após a incubação para uma nova placa de cultura de células com o mesmo meio de cultura e 0,1 ml da suspensão contendo o microrganismo seguinte foi adicionada e incubada por mais 24 h nas mesmas condições, sequencialmente, conforme consta no Quadro 2.

Após 48 h de incubação a 37 °C com 5% de CO₂, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) foi determinado para cada implante. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentaram entre 30 e 300 UFC/ml (Figura 1). A contagem de colônias foi realizada em aparelho contador de colônias (Phoenix Luferco CP-600, Araraquara, Brasil).

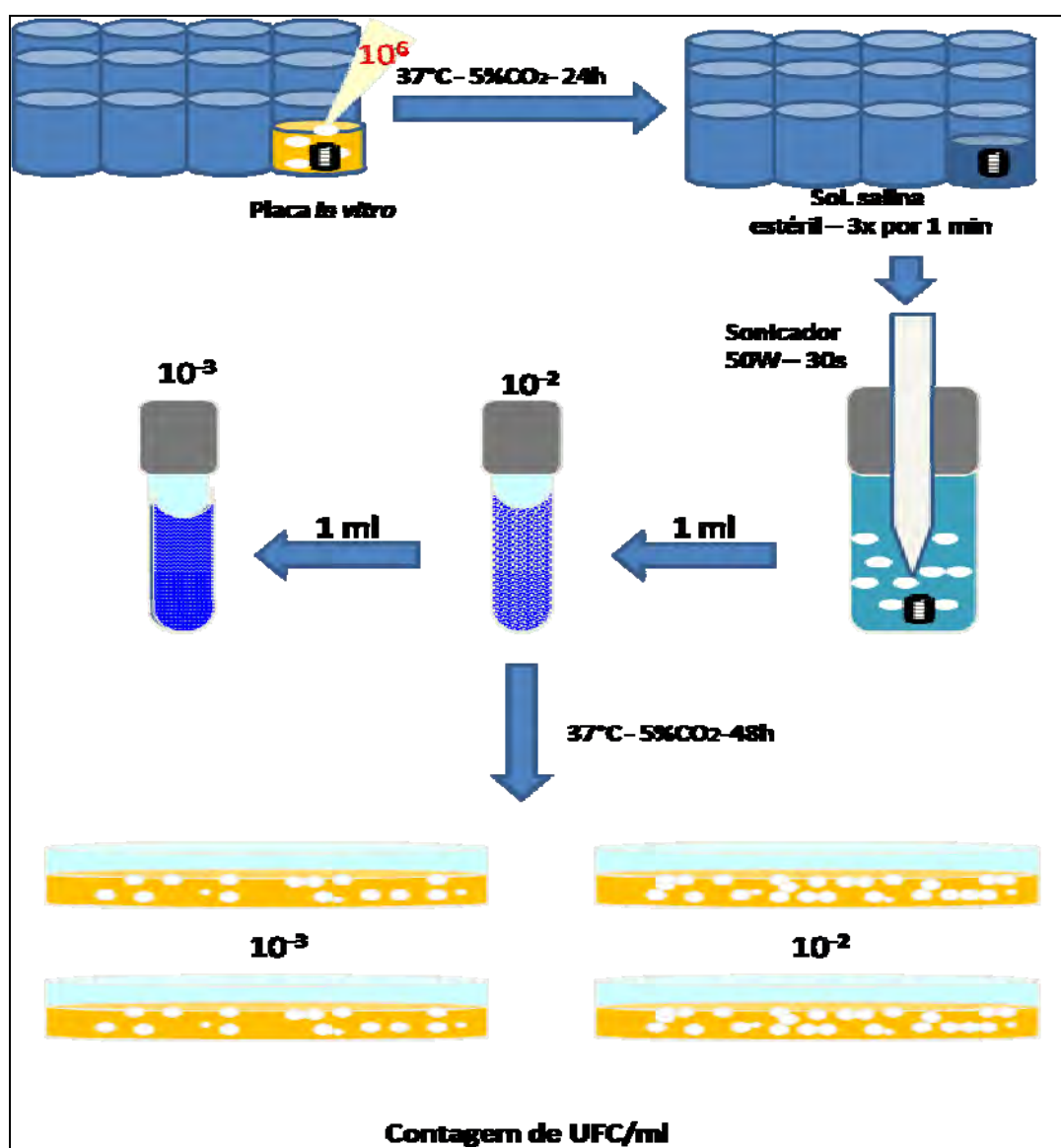


Figura 1 – Fluxograma ilustrativo da metodologia utilizada nos testes de aderência.

4.4.1 Aderência *in vitro* de *S. sanguinis*

Para análise da aderência do microrganismo *S. sanguinis*, estes foram semeados em placas de Petri contendo ágar BHI (broth heart infusion). A partir do crescimento foram preparadas suspensões padronizadas por análise em espectrofotometria, sendo que para *S. sanguinis* e *S. mutans* foi utilizado o comprimento de onda de 398 nm e DO (densidade óptica) 0,620.

Foi utilizado ágar Mitis-Salivarius (Difco, Detroit, USA) para contagem de UFC/ml. Quando da associação de *Streptococcus* com *Candida* foi utilizado ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (Pfizer do Brasil – Guarulhos, Brasil) (0,2 UI/ml de meio) e 15% de sacarose (MSBS). A diferenciação entre *S. sanguinis* e *S. mutans* foi feita analisando-se a morfologia de colônia. *S. mutans* apresenta aspecto de vidro esmerilhado e *S. sanguinis*, mucoso.

4.4.2 Aderência *in vitro* de *C. albicans*

C. albicans foi semeada em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Para obtenção da solução padronizada em espectrofotometria foi utilizado comprimento de onda de 530 nm e densidade ótica (DO) 0,284.

Para contagem de unidades formadoras de colônia, foi utilizado ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Quando da associação dos microrganismos foi utilizado ágar Sabouraud Dextrose

com cloranfenicol (Pfizer do Brasil – Guarulhos, Brasil) (0,1 mg/ml de meio).

4.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura

Para ilustrar a aderência de *S. sanguinis* isolado e as associações com *C. albicans* e com *S. mutans* e *C. albicans*, foi selecionado um implante de cada grupo e de cada superfície para ser submetido à análise em microscopia eletrônica de varredura (Quadro 3).

Quadro 3 - Distribuição dos implantes que foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura

Grupo	Número de Implantes			
	Lisa	Jateada	Anodizada	Ataque ácido
Controle	3	3	3	3
Saliva humana	3	3	3	3
Plasma humano	3	3	3	3
Total	9	9	9	9

Após a incubação dos implantes em caldo placa in vitro contendo suspensão padronizada dos microrganismos à 37^o C, 5% de CO₂ por 24 h, os implantes foram removidos do caldo e foi realizada a fixação dos microrganismos aderidos na superfície dos implantes. Para essa fixação, os implantes foram submersos em glutaraldeído 2,5% por 1

hora e em seguida, em solução alcoólica a 10%, 25%, 50%, 75% e 90% por vinte min em cada. Finalmente por uma hora em álcool a 100%.

Com os microrganismos fixados à superfície dos implantes, foi realizada a metalização com plasma de ouro, em uma metalizadora (Denton Vacuum - EUA). Posteriormente, a aderência dos microrganismos foi visualizada no microscópio eletrônico de varredura (Jeol – JSM5310 - Japão) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE – São José dos Campos - SP) em aumento de 5000 vezes.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística, os resultados obtidos nos testes de aderência dos grupos estudados foram convertidos em logarítimo de 10 e submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Aderência de *S. sanguinis*

Para avaliar a aderência de *S. sanguinis* às superfícies de implantes dentários com diferentes tratamentos de superfície, puros e após imersão em saliva e plasma humanos, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey com nível de significância de 5%. As médias e desvios padrões (log UFC/ml) da aderência são apresentados na Tabela 1.

S. sanguinis isoladamente apresentou menor aderência em todos os grupos estudados. Este microrganismo associado com *S. mutans* e/ou com *C. albicans*, demonstrou maior capacidade de aderência nos três grupos estudados (puro, saliva e plasma humanos) e em todas as diferentes superfícies dos implantes.

A diferença na quantidade de *S. sanguinis* aderido às diversas superfícies do estudo foi relativamente pequena, mas estatisticamente significativa na maioria dos casos com exceção da associação com *S. mutans* na presença da saliva.

Os implantes submetidos ao tratamento com duplo ataque ácido demonstraram maior concentração de *S. sanguinis* aderidos. O microrganismo isolado e associado com *C. albicans* demonstrou estatisticamente uma maior quantidade de microrganismos aderidos, comparando os grupos (controle, saliva e plasma). Quando associado com *S. mutans* apenas os implantes tratados previamente com plasma demonstraram maior aderência ($6,39 \pm 0,05$) nesta superfície. No biofilme

formado pela associação dos três microrganismos o tratamento com duplo ataque ácido também apresentou maior aderência na maioria dos grupos.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões do Logarítmo de UFC/ml de *Streptococcus sanguinis* isolado e em associações, presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície com e sem imersão em saliva e plasma humanos (n=10)

Microrganismos	Lisa (controle)	Anodizada	Jateada	Ataque Ácido	p(ANOVA)
<i>S. sanguinis</i>					
Puro	4,90±0,11 ^A	4,47±0,13 ^C	4,63±0,11 ^B	4,90±0,11 ^A	0,000
Saliva	4,74±0,14 ^{B/C}	4,68±0,11 ^C	4,84±0,09 ^B	5,20±0,12 ^A	0,000
Plasma	4,57±0,15 ^B	4,06±0,11 ^C	4,67±0,07 ^{A/B}	4,79±0,11 ^A	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>S. mutans</i>					
Puro	6,21±0,02 ^A	6,12±0,12 ^B	6,16±0,03 ^{A/B}	6,08±0,08 ^B	0,002
Saliva	6,12±0,32	6,16±0,10	6,13±0,03	6,19±0,03	0,783
Plasma	6,22±0,03 ^B	6,15±0,02 ^C	5,99±0,09 ^D	6,39±0,05 ^A	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>C. albicans</i>					
Puro	5,92±0,04 ^B	6,12±0,08 ^A	6,08±0,03 ^A	6,07±0,07 ^A	0,000
Saliva	5,93±0,05 ^B	6,12±0,08 ^A	6,11±0,03 ^A	6,05±0,05 ^A	0,000
Plasma	5,83±0,07 ^C	6,03±0,04 ^B	6,09±0,02 ^{A/B}	6,13±0,09 ^A	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>					
Puro	6,27±0,07 ^A	6,08±0,03 ^B	6,09±0,21 ^B	6,37±0,06 ^A	0,000
Saliva	6,33±0,02 ^A	6,19±0,08 ^B	6,11±0,17 ^B	6,39±0,06 ^A	0,000
Plasma	6,15±0,02 ^C	6,29±0,02 ^B	6,37±0,06 ^A	6,31±0,02 ^B	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>					
Puro	6,39±0,05 ^A	6,16±0,10 ^C	6,16±0,06 ^C	6,27±0,04 ^B	0,000
Saliva	6,33±0,02 ^A	6,20±0,05 ^B	6,24±0,06 ^B	6,35±0,05 ^A	0,000
Plasma	6,29±0,02 ^B	6,14±0,03 ^C	6,28±0,02 ^B	6,39±0,05 ^A	0,000

Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey, com nível de significância 5%, comparando o tratamento dos implantes: letras diferentes indicam significância estatística.

Já os implantes submetidos ao tratamento por anodização, em geral, apresentaram menor aderência entre as superfícies

estudadas, apresentando-se estatisticamente menor na análise de *S. sanguinis* isolado (nos três grupos), associado com *S. mutans* e associado com *S. mutans* e *C. albicans* com exceção do grupo plasma da associação com *S. mutans* seguido de *C. albicans* ($6,29 \pm 0,02$).

Os implantes com superfícies tratadas com jateamento de cerâmica de fosfato de cálcio e com superfície lisa apresentaram médias semelhantes e intermediárias, comparados às outras superfícies relatadas.

A comparação da formação de biofilme de acordo com os três grupos estudados (controle, saliva e plasma) estão apresentados nas Figuras de 2 a 4. Pode-se verificar que as médias de aderência são muito semelhantes e que *S. sanguinis* isoladamente apresentou os menores valores de aderência.

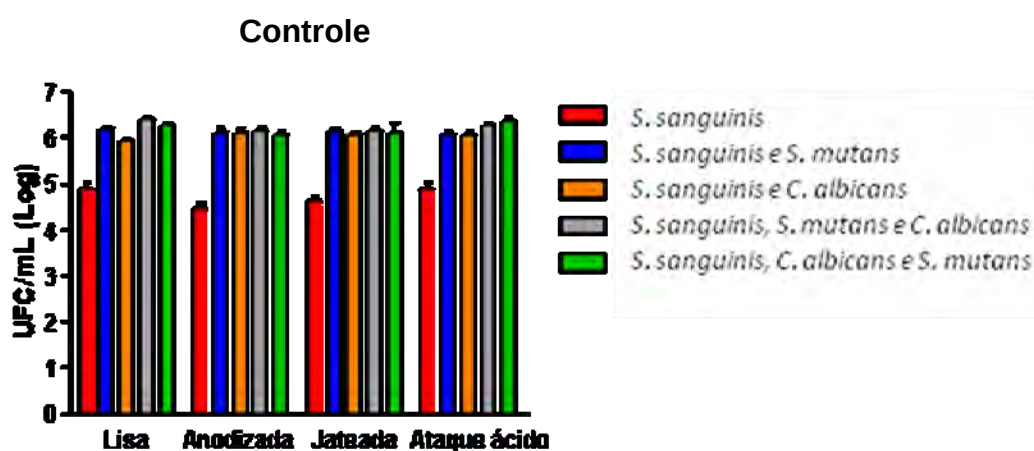


Figura 2 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *S. sanguinis* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície no grupo controle.

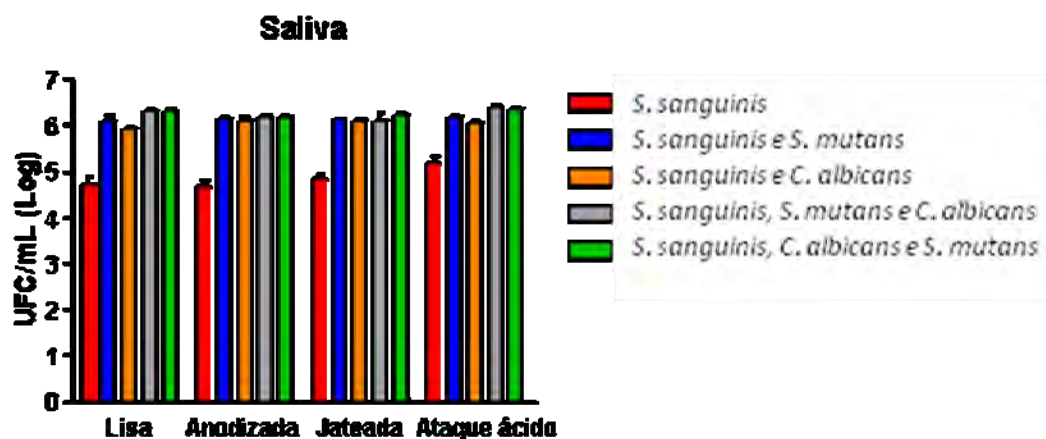


Figura 3 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *S. sanguinis* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície na presença de saliva humana.

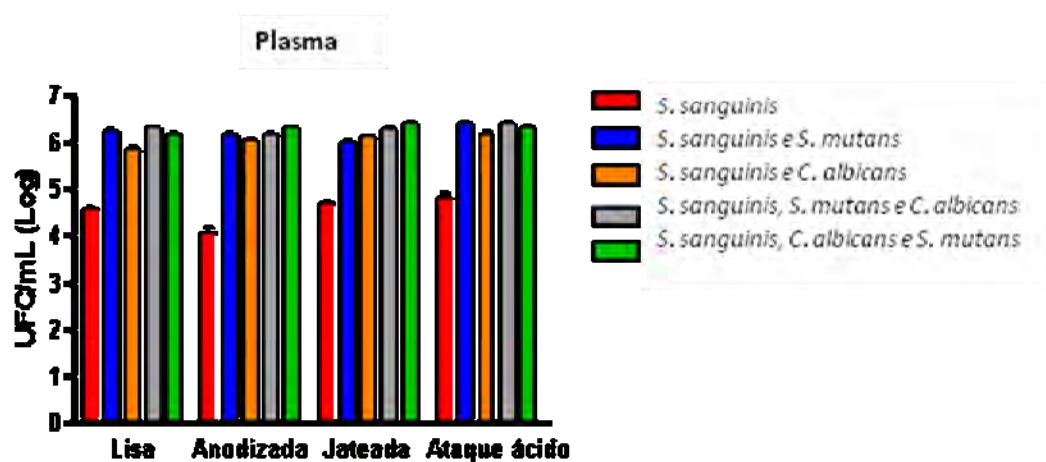


Figura 4 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *S. sanguinis* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície na presença de plasma humano.

5.2 Aderência de *C. albicans*

A aderência de *C. albicans* às superfícies de implante com diferentes tratamentos, puro e após imersão em saliva e soro humanos, também foi avaliada. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), teste de Tukey, com nível de significância 5%. As médias e desvios padrões (log UFC/mL) se encontram na Tabela 2.

A aderência de *C. albicans* à superfície dos implantes foi menor quando comparado a aderência de *S. sanguinis* em todas as superfícies, nos três grupos.

Em relação às diferentes superfícies, não houve diferença estatística entre elas quando da aderência de *C. albicans* isolada no grupo puro, na associação entre *S. sanguinis*, *C. albicans* e *S. mutans* no grupo plasma e na associação *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans* no grupo saliva. Nos demais experimentos, apesar de pequena, houve diferença estatística entre a aderência deste microrganismo às superfícies.

Após análise dos dados verificou-se resultados semelhantes entre a aderência de *C. albicans* nas quatro superfícies avaliadas com maior aderência nas superfícies jateadas com cerâmica de fosfato de cálcio, seguida da superfície tratada com duplo ataque ácido. Novamente a superfície anodizada apresentou menor aderência.

A formação de biofilme de acordo com os três grupos puro, saliva e plasma estão demonstrados nas figuras de 5 a 7. Os maiores valores de aderência de *C. albicans*, foram encontrados na associação entre *S. sanguinis*, *C. albicans* e *S. mutans* nos três grupos.

Tabela 2 – Médias e desvios padrões do Logarítmo de UFC/ml de *C. albicans* isolado e em associações, presente em biofilme formado in vitro em implantes com diferentes tratamentos de superfície com e sem imersão em saliva e plasma humanos (n=10)

Microrganismos	Lisa (controle)	Anodizada	Jateada	Ataque Ácido	p(ANOVA)
<i>C. albicans</i>					
Puro	4,17±0,47	4,16±0,18	4,44±0,34	4,13±0,15	0,132
Saliva	4,10±0,33 ^C	4,71±0,14 ^{A/B}	4,94±0,10 ^A	4,48±0,18 ^B	0,000
Plasma	4,27±0,14 ^A	3,77±0,22 ^C	4,01±0,24 ^B	4,14±0,14 ^{A/B}	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>C. albicans</i>					
Puro	4,05±0,19 ^A	3,35±0,21 ^C	4,14±0,24 ^A	3,78±0,18 ^B	0,000
Saliva	3,79±0,26 ^{A/B}	3,95±0,25 ^C	4,15±0,11 ^A	3,70±0,23 ^B	0,000
Plasma	3,66±0,28 ^{A/B}	3,72±0,22 ^B	4,10±0,23 ^A	3,69±0,31 ^B	0,000
<i>S. sanguinis</i> + <i>C. albicans</i> + <i>S. mutans</i>					
Puro	4,63±0,10 ^B	4,84±0,05 ^A	4,81±0,04 ^A	4,65±0,10 ^B	0,000
Saliva	4,88±0,06 ^{A/B}	4,82±0,06 ^B	4,89±0,06 ^{A/B}	4,90±0,06 ^A	0,023
Plasma	4,86±0,06	4,79±0,11	4,80±0,05	4,78±0,05	0,113
<i>S. sanguinis</i> + <i>S. mutans</i> + <i>C. albicans</i>					
Puro	4,13±0,09 ^A	3,89±0,30 ^B	3,95±0,13 ^B	3,91±0,13 ^B	0,032
Saliva	4,11±0,14	4,18±0,10	4,18±0,10	4,13±0,08	0,350
Plasma	4,23±0,09 ^A	4,37±0,07 ^A	4,08±0,13 ^B	4,29±0,12 ^A	0,000

Análise de Variância ANOVA, teste de Tukey, com nível de significância 5%, comparando o tratamento dos implantes: letras diferentes indicam significância estatística.

A associação de *S. sanguinis*, *C. albicans* e *S. mutans* apresentou a maior concentração de *C. albicans* aderida às superfícies e grupos estudados.

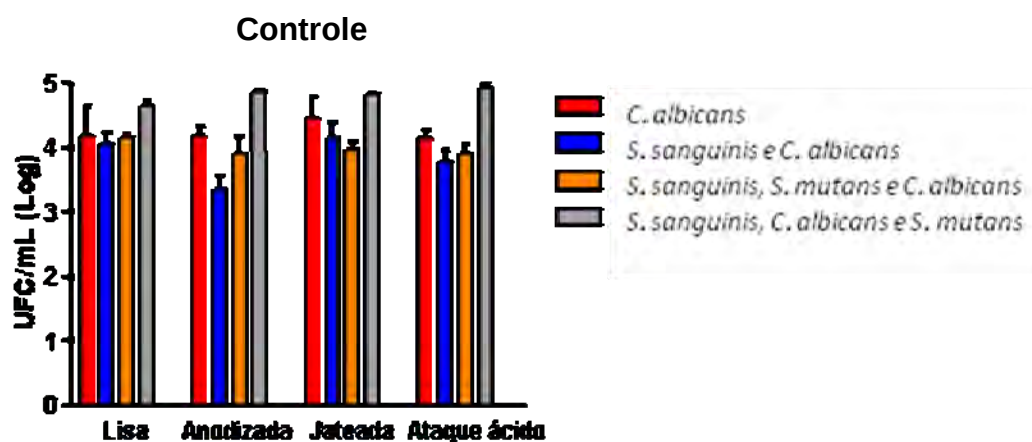


Figura 5 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *C. albicans* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície no grupo controle.

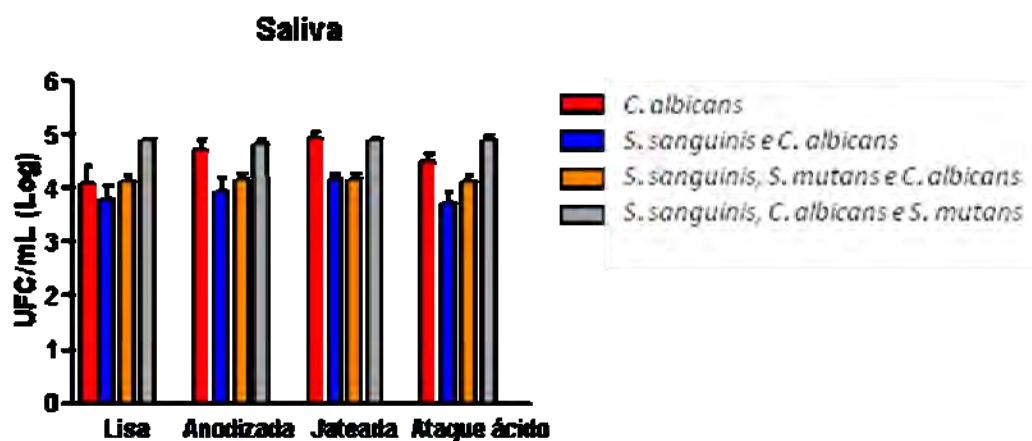


Figura 6 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *C. albicans* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície na presença de saliva humana.

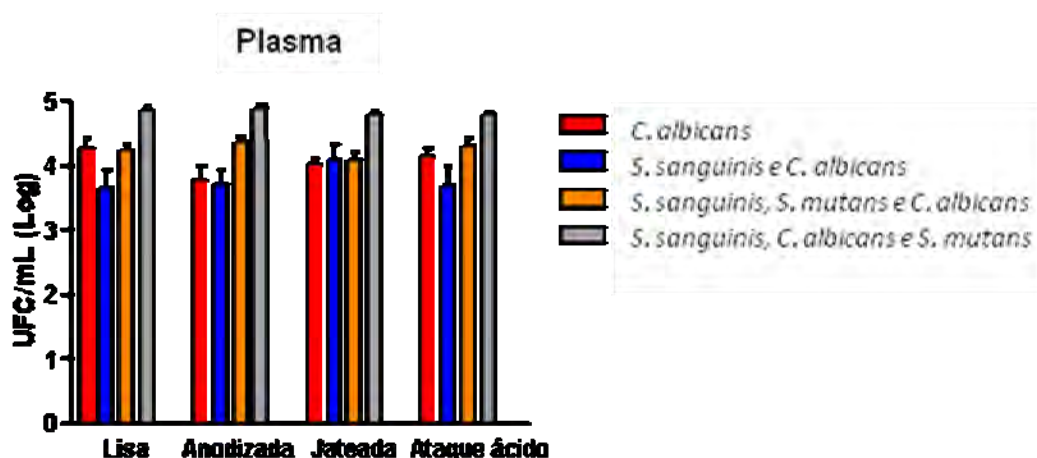


Figura 7 – Médias do Logarítmo de UFC/ml de *C. albicans* isolado e em associações presente em biofilme formado *in vitro* em implantes com diferentes tratamentos de superfície na presença de plasma humano.

5.3 Aderência em Microscopia eletrônica de Varredura

Inicialmente foram realizadas micrografias das superfícies dos implantes previamente a incubação dos microrganismos (Figura 8).

Após a avaliação dos dados em UFC/ml e a análise estatística, foi realizada formação de biofilme de *S. sanguinis* isolado e das associações de *S. sanguinis* e *C. albicans* e *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans* nas quatro superfícies e três grupos estudados, os quais foram visualizados em microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de ilustrar o experimento (Figuras de 9 à 17).

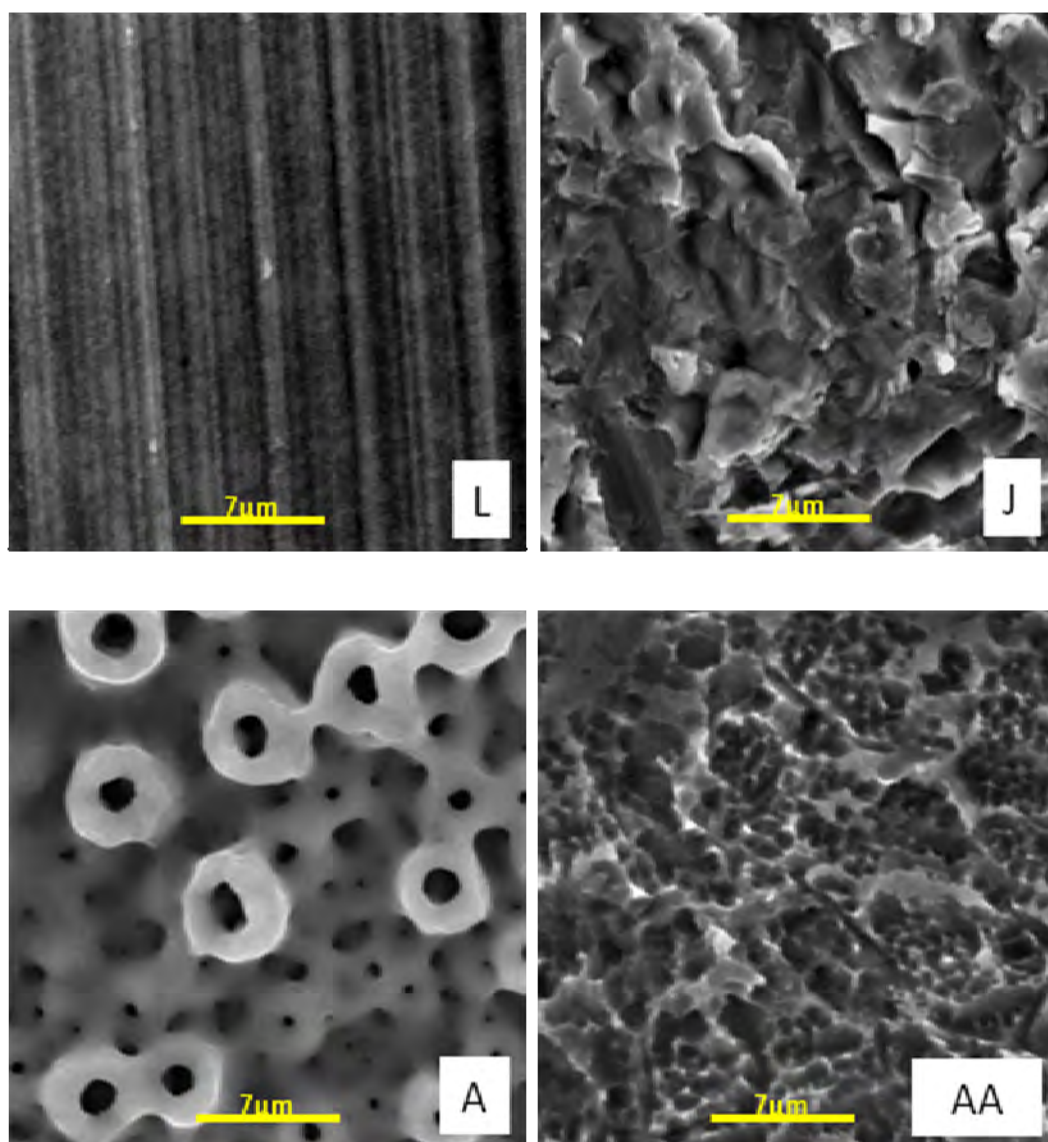


Figura 8 - Micrografias representativas das superfícies analisadas L (lisa), J (jateada com cerâmica de fosfato de cálcio), A (anodizada) e AA (submetida a duplo ataque ácido) (5.000 x).

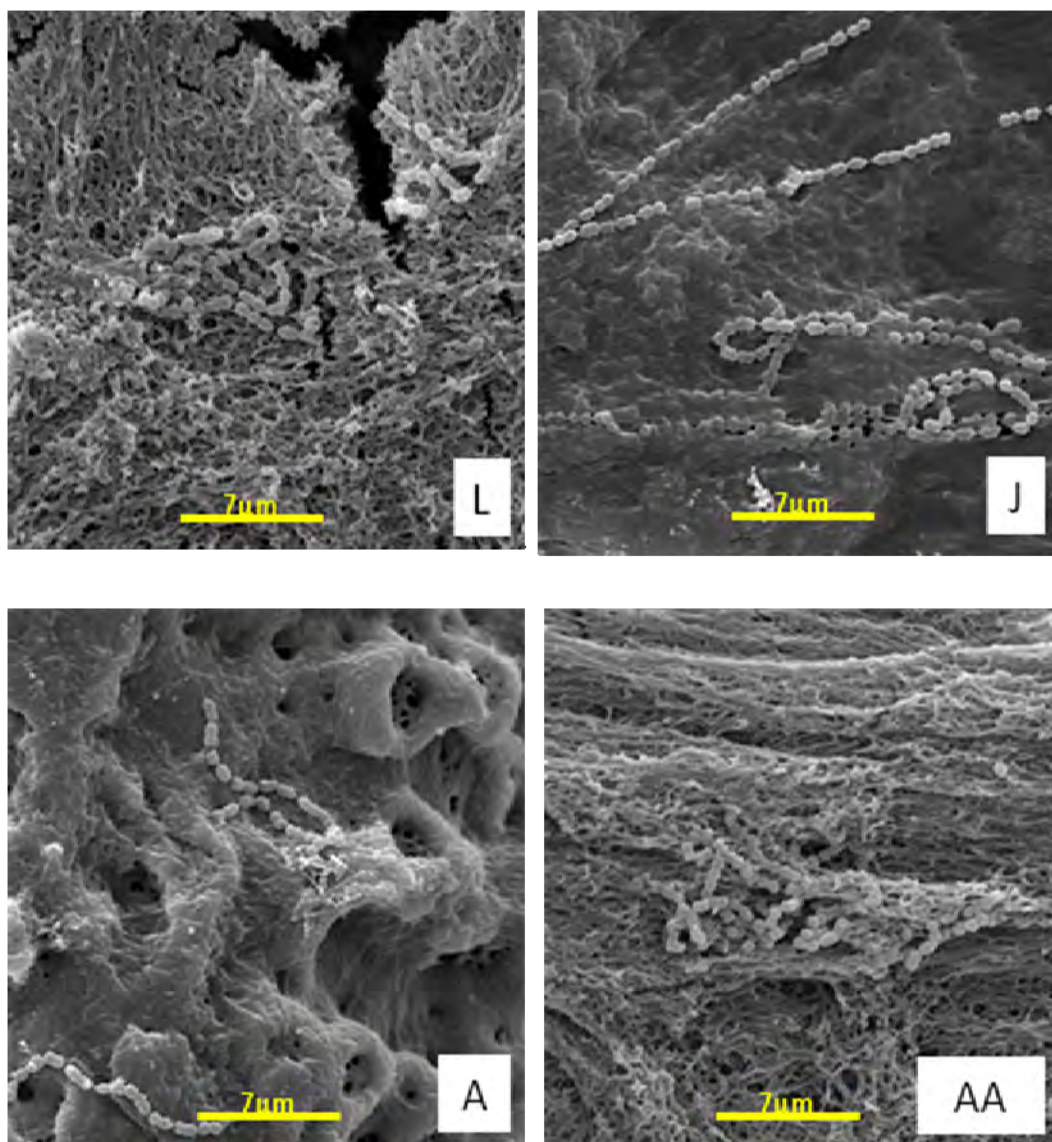


Figura 9 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* isolado, no grupo controle, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

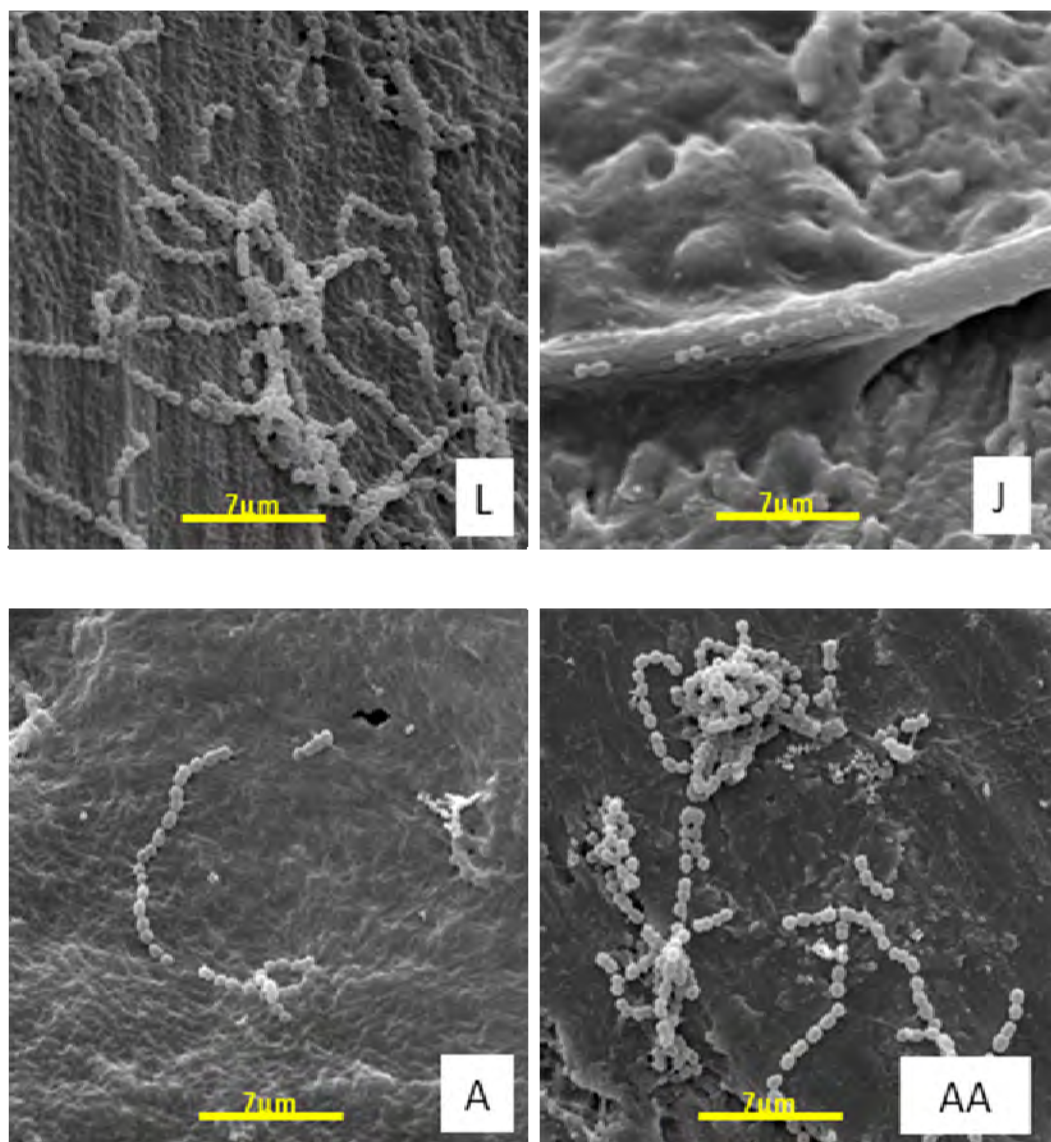


Figura 10 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* isolado, no grupo saliva, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

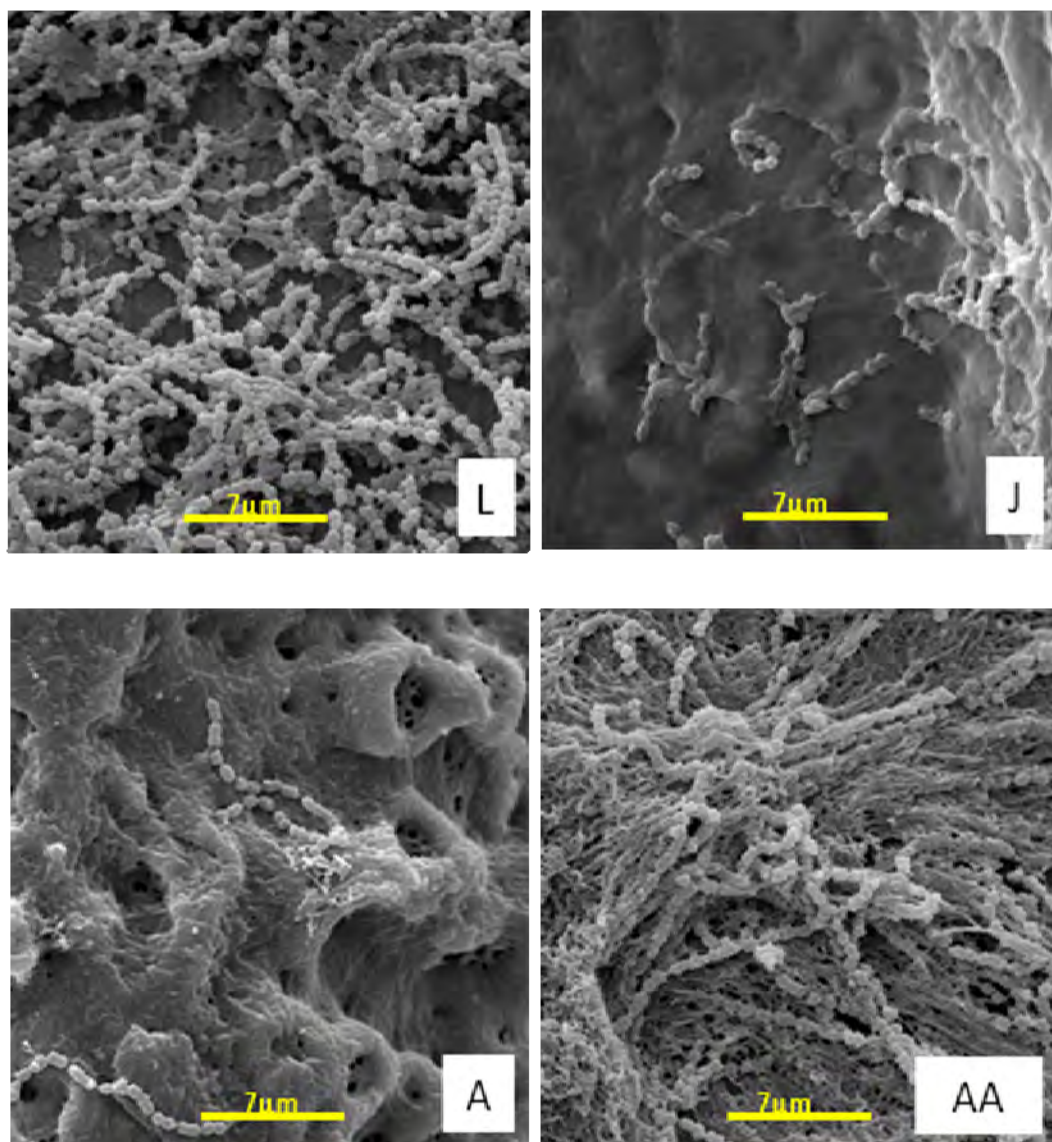


Figura 11 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* isolado, no grupo plasma, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

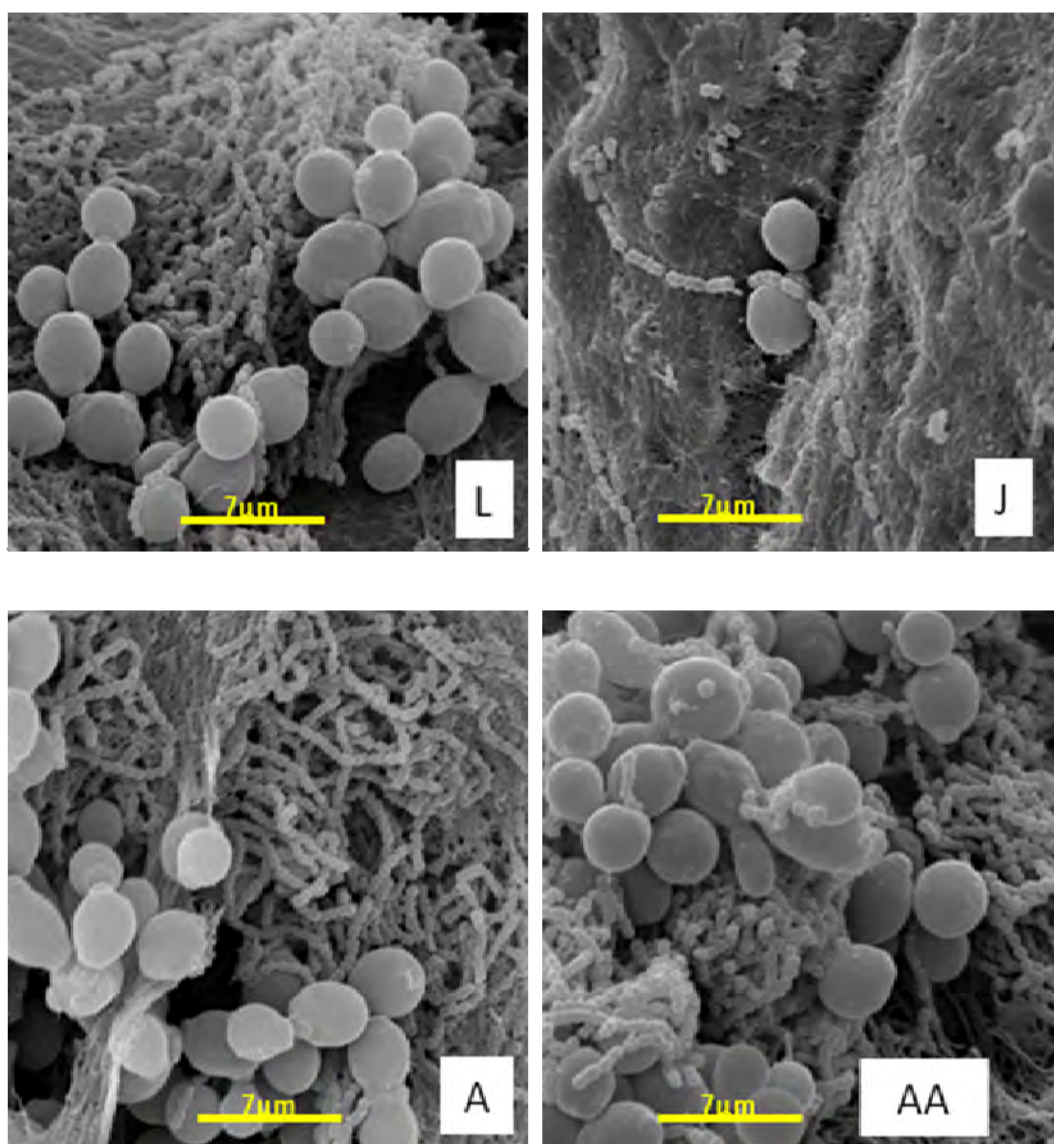


Figura 12 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* associado a *C. albicans*, no grupo controle, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

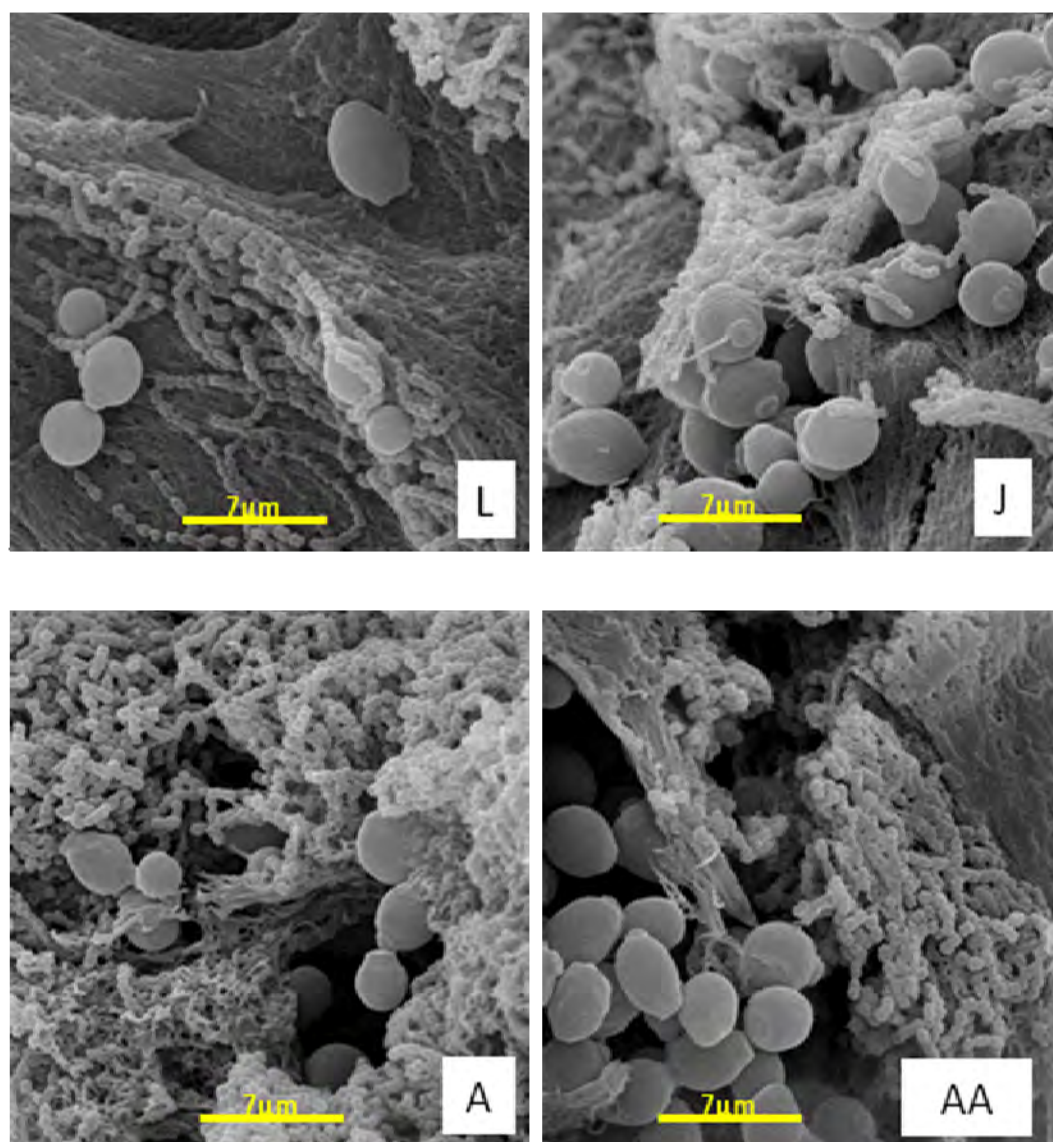


Figura 13 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* associado a *C. albicans*, no grupo saliva, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

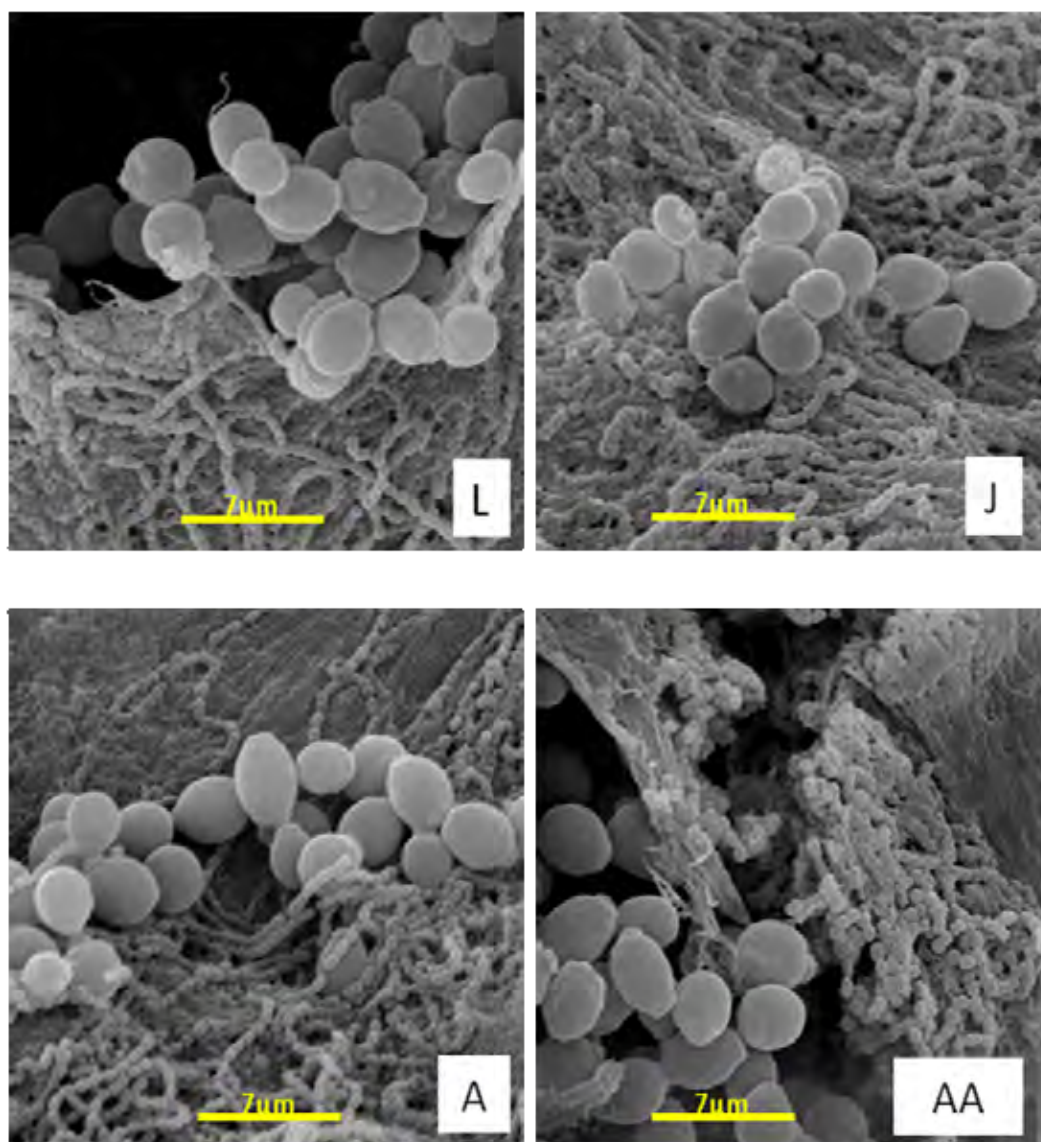


Figura 14 - Micrografias representativas da aderência de *S. sanguinis* associado a *C. albicans*, no grupo plasma, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

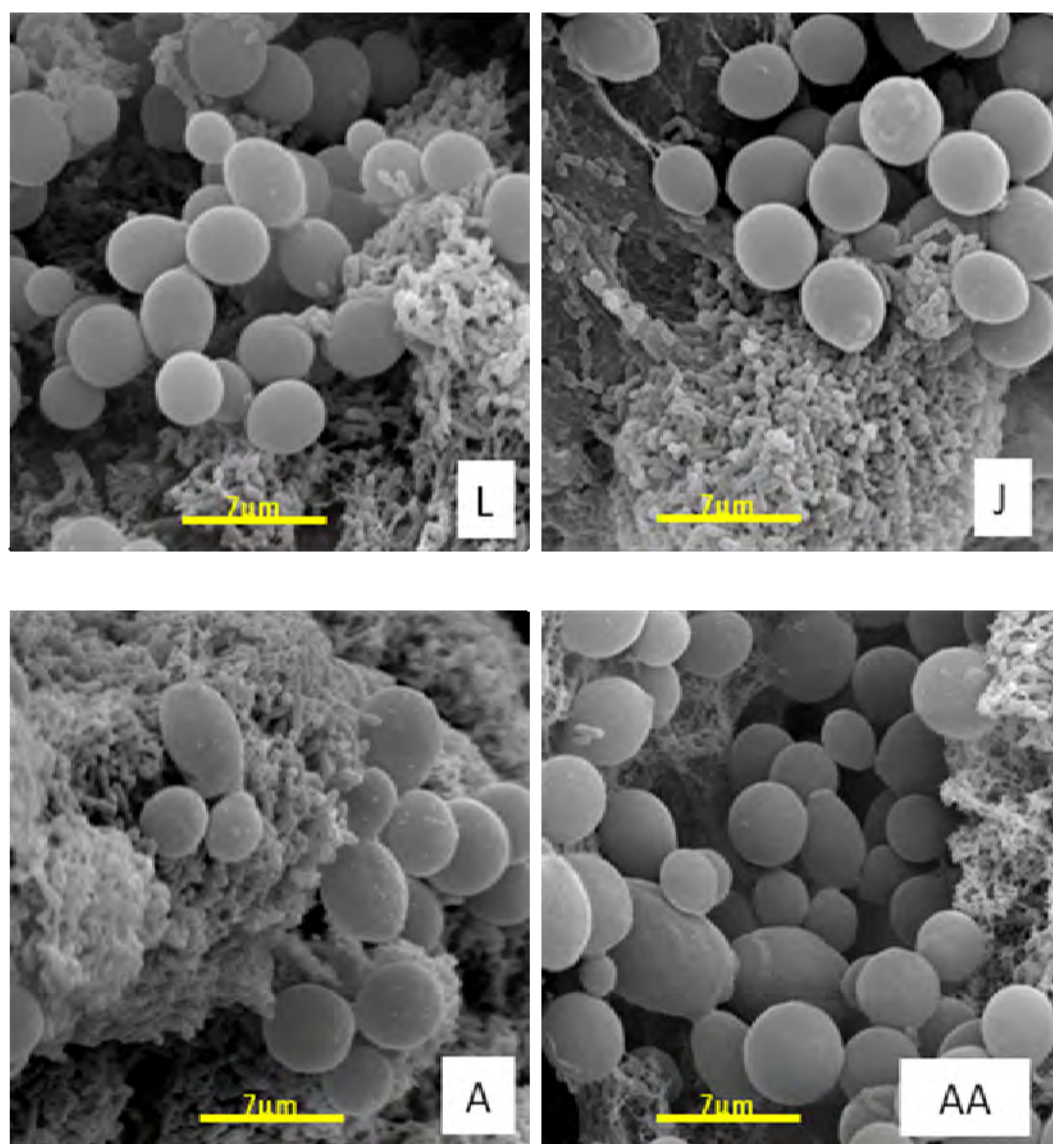


Figura 15 - Micrografias representativas da aderência da associação de *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans*, no grupo controle, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

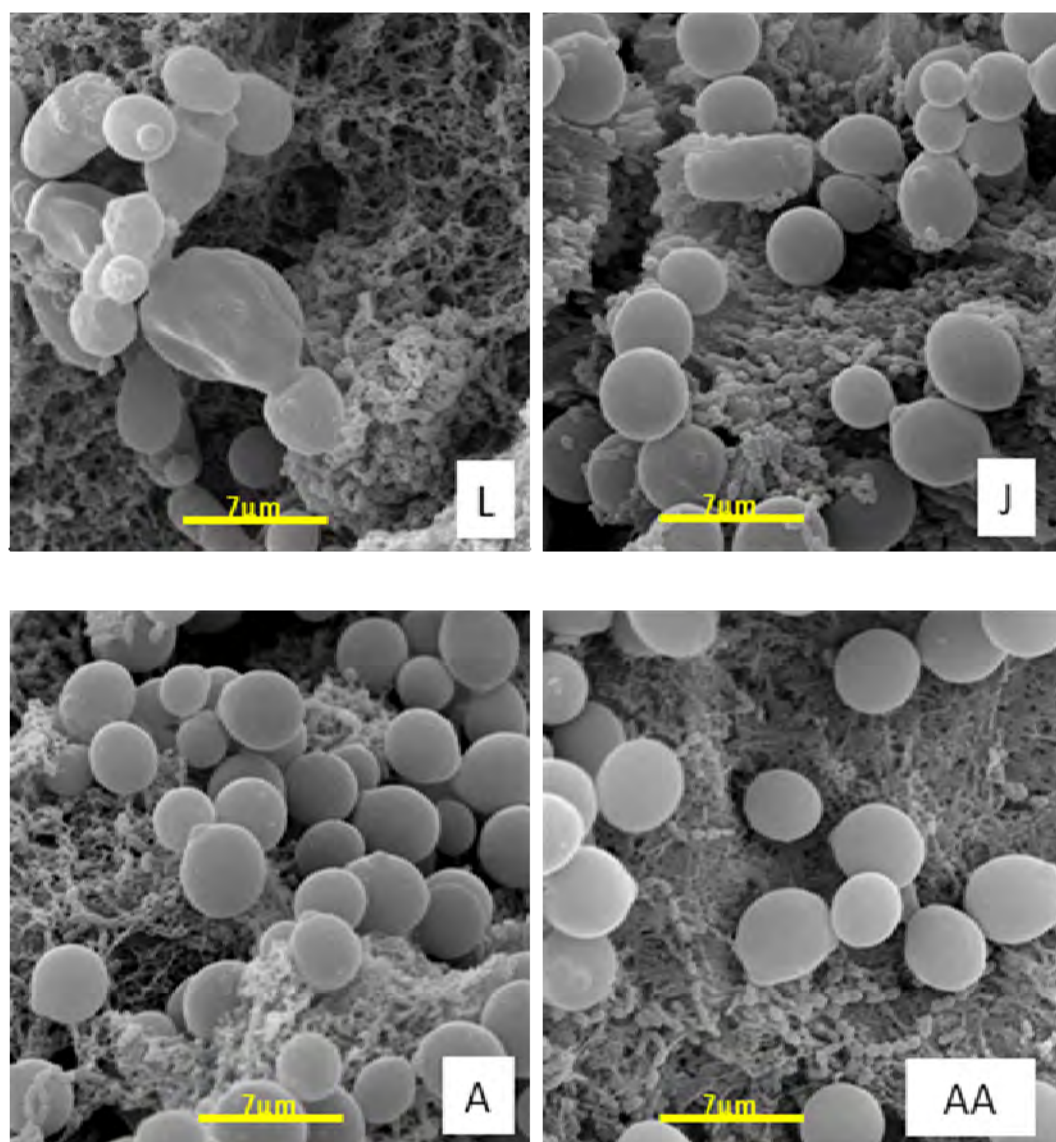


Figura 16 - Micrografias representativas da aderência da associação de *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans*, no grupo saliva, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

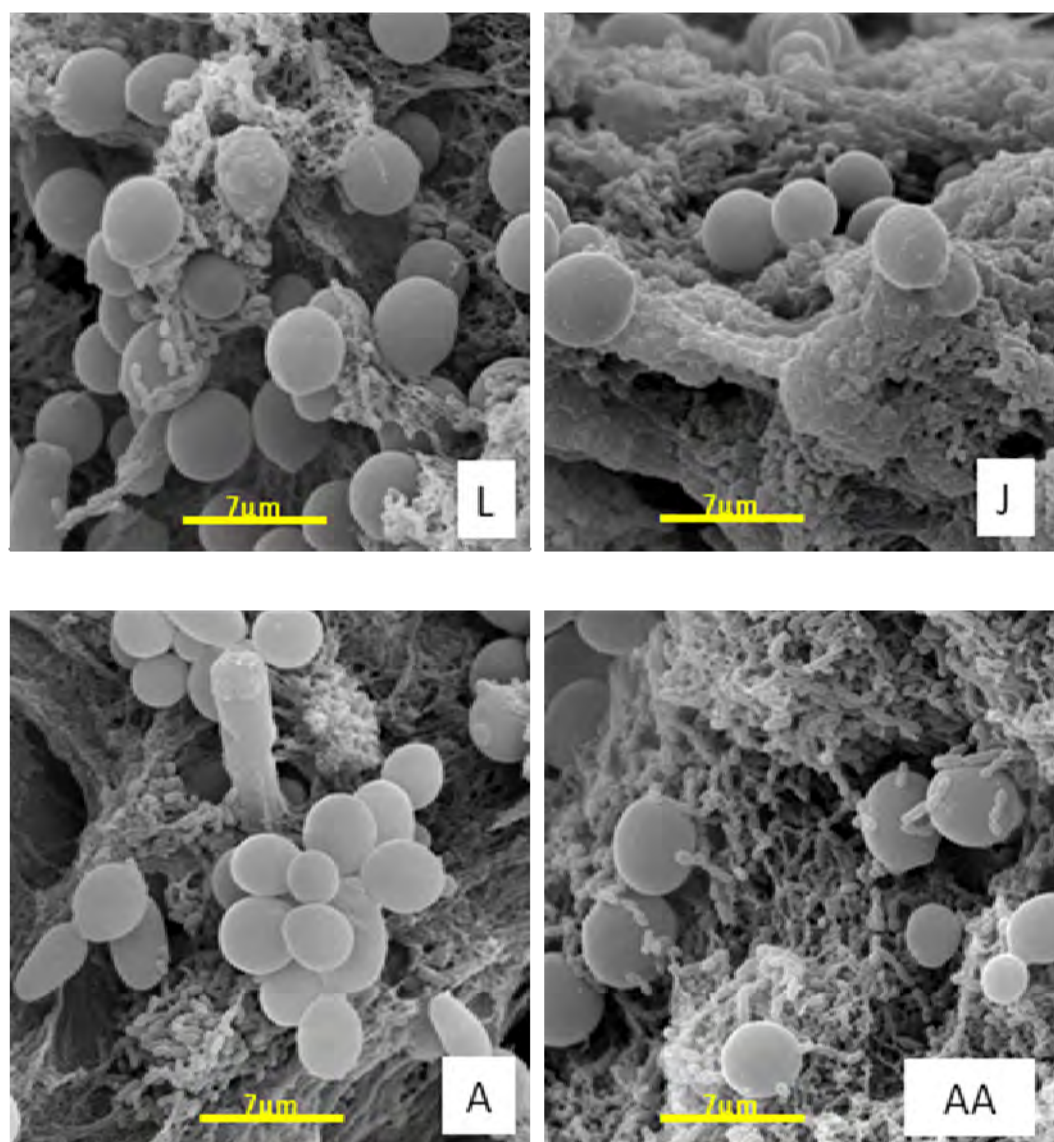


Figura 17 - Micrografias representativas da aderência da associação de *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans*, no grupo plasma, às superfícies lisa (L) e tratadas com jateamento (J), anodização (A) e duplo ataque ácido (AA) (5.000 x).

6 DISCUSSÃO

Estudos demonstraram que a periimplantite possui uma patogênese semelhante ao da doença periodontal (Ong et al., 1992; Mombelli; Lang, 1998; Radford et al., 1998; Persson et al., 2006). A correlação entre acúmulo de biofilme, presença de periodontopatógenos e nível de perda óssea ao redor do tecido periimplantar já foi comprovada (Apse et al., 1989; Quirynen et al., 1996; Devides; Franco, 2006; Persson et al., 2006; Furst et al., 2007; Heuer et al., 2007; Pongnarisorn et al., 2007).

Em pacientes edêntulos, a área subgengival ao redor dos implantes apresenta principalmente cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e bastonetes não móveis. Em periimplantes saudáveis, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mitis* são os microrganismos predominantes (Mombelli, Lang, 1994). A microbiota periimplantar em pacientes edêntulos é comparada à microbiota que coloniza tecidos moles de pacientes edêntulos sem implantes e a subgengival de pacientes periodontalmente sadios (Danser et al., 1995; Leonhardt et al., 1999; Listgarten; Lai, 1999; Sumida et al., 2002; Leitão et al., 2005; Heuer et al., 2007; Pongnarisorn et al., 2007; Shibli et al., 2007; Rupani et al., 2008).

A formação inicial do biofilme pode ser influenciada por diferentes superfícies de implantes (Ruona et al. 1991; Silva et al., 2005). A aderência de microrganismos à implantes dentários parece ser diretamente proporcional à rugosidade de sua superfície (Nakazato, 1989). Um estudo *in vivo* expondo diferentes materiais de implantes à microbiota bucal demonstrou que estreptococos foram os microrganismos predominantes no biofilme e que a quantidade e qualidade do biofilme

formado foram relacionadas aos tipos de superfícies dos implantes (Lindhe et al., 1992).

A aderência e colonização bacteriana foram consideradas fatores chaves no insucesso dos implantes dentários (Rimondini et al., 1997). A periimplantite não ocorre sem prévia aderência microbiana e subsequente colonização. A aderência depende do tipo de microrganismo, das propriedades físico-químicas da superfície do implante e da presença de fluidos bucais interpostos entre os microrganismos e as superfícies dos implantes (Pratt-Terpstra et al., 1987; Gatewood et al., 1993).

Assim, torna-se necessário estudar a influência das superfícies dos implantes sobre a aderência microbiana e conseqüente formação de biofilme dentário. Para isso, foram avaliadas a aderência dos microrganismos *S. sanguinis* e *C. albicans* isoladamente e em associações com *S. mutans* formando biofilmes microbianos.

A escolha destes microrganismos justifica-se pelo fato de *S. sanguinis* ser um colonizador primário do biofilme dentário (Hauser-Gerspach et al., 2007). *C. albicans* é um fungo oportunista associado ao desenvolvimento de candidose. Esta doença é comum em pacientes imunodeprimidos e pode evoluir de uma relação de comensalismo a uma doença fatal (Ghannoum, 2000; Migliorati et al., 2004). *S. mutans*, apesar de apresentar maior importância na cariogênese, está presente em biofilmes de superfícies sólidas presentes na boca, associado a outros microrganismos (Wolinsky et al., 1989). Além disso, possui uma relação de comensalismo com *S. sanguinis* (Jorge, 2007) e a coagregação com *C. albicans* parece intensificar a aderência de ambos os microrganismos à superfície dentária e em materiais odontológicos (Holmes et al., 1995; Sen et al. 1997; Nikawa et al. 2003; Eick et al., 2004).

As leveduras do gênero *Candida* apresentam diferentes fatores de virulência como, aderência aos tecidos do hospedeiro, produção de enzimas histolíticas e formação de hifas, que facilitam a

invasão tecidual (Tsang; Macmillan, 2007). A aderência é considerada a primeira etapa no processo de infecção, sendo importante para a colonização e invasão nos tecidos do hospedeiro. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos para quantificar e caracterizar a aderência dessas leveduras em superfícies celulares e superfícies inanimadas, tal como resinas acrílicas e implantes dentários (Branting et al., 1989; Radford et al., 1998; Pires et al., 2001; Pereira et al., 2007; Marcacci et al. 2008).

Rasperini et al. em 1998 analisaram a presença de *Candida* no sulco periimplantar de 24 pacientes e encontraram 88,23% de sítios positivos para *C. albicans*.

Leonhardt et al. (1999) estudaram a microbiota subgengival de 37 indivíduos com implantes de titânio que apresentavam periimplantites. Patógenos periodontais, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foram isolados em 60% dos casos de periimplantites. Microrganismos que não estão associados primariamente com periodontite, também foram isolados (55% dos casos), incluindo *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* e *Candida* spp.

A idéia de se formar um biofilme com esses microrganismos ocorreu pela possibilidade de se criar um ambiente semelhante ao que encontramos em periimplantes saudáveis, como comprovado por Quirynen e Listgarten (1990) e Persson et al. (2006). Consequentemente, analisamos a aderência dos microrganismos isoladamente e se a associação dos mesmos, em função das interações específicas entre os microrganismos, alterariam a quantidade e qualidade desta adesão.

Além disso, o modelo de biofilme empregado neste estudo visou demonstrar a importância da película adquirida, formada pela saliva e plasma humanos, nesta aderência. Este modelo preconizou a formação de película adquirida sobre as amostras previamente à

colonização bacteriana. Este passo foi descrito por Guggenheim et al. (2000), mantendo as amostras imersas em saliva antes da incubação.

Na presença de película adquirida, *S. sanguinis* é o primeiro microrganismo a se aderir e colonizar as superfícies sólidas da boca. Além de aderir à película adquirida, *S. sanguinis* interage com outros componentes salivares como imunoglobulina A, mucina, aglutinina e α -amilase (Kawashima et al., 2003). Por este motivo, optamos por incluir na metodologia do presente estudo, a aderência de microrganismos na presença de saliva e plasma humanos, realizando sempre a incubação inicial com *S. sanguinis* quando da associação de microrganismos.

Atualmente, os implantes dentários de titânio têm recebido vários tratamentos de superfícies como jateamento de plasma, recobrimento com hidroxiapatita, ataque ácido, anodização, jateamento com cerâmica, jateamento com óxido de titânio, entre outros. Esses tratamentos têm por finalidade aumentar a rugosidade da superfície do implante, contribuindo para uma melhor osseointegração. Entretanto, tem sido demonstrado que a rugosidade da superfície do implante pode estar correlacionada com o grau de colonização microbiana na superfície dos implantes dentários (Pratt-Terpstra et al., 1987).

Shibli et al. (2003) avaliaram a microbiota da periimplantite induzida por ligadura em cães após a instalação de implantes dentários de titânio com 4 superfícies diferentes: comercialmente puro, jateado com plasma, recoberto por hidroxiapatita e tratado com ácido. Decorridos 60 dias da introdução da ligadura, esses autores encontraram *Prevotella intermedia* em 100% dos implantes instalados, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium* spp. em 29,03% e *Streptococcus* spp. em 77,42%. *Campylobacter* spp. e *Candida* spp. também foram detectados na superfície dos implantes, entretanto em menores proporções. Esses microrganismos foram observados na superfície de todos os implantes, independente do tipo de superfície estudada.

Tendo em vista que, atualmente, novas superfícies estão disponíveis para uso clínico, para este experimento foram selecionados implantes comumente utilizados no mercado internacional, e que apresentavam diferenças no processo de tratamento de suas superfícies. Utilizamos implantes tratados por subtração de partículas através do processo de anodização (Albrektson; Wennerberg, 2004), implantes submetidos à jateamento com partículas de fosfato de cálcio (Gonshor et al., 2003) e implantes com condicionamento de sua superfície através do duplo ataque ácido, utilizando ácido clorídrico e fosfórico (Al-Nawas, 2007). Como controles, foram utilizados implantes de superfície lisa.

O método de quantificação da aderência utilizado foi por meio de cultura e contagem de UFC/ml, método utilizado pela maioria dos autores (Wollinsky et al. 1989; Percival et al., 2006; Pereira et al., 2007; Romeiro et al., 2009). Outro método possível é a quantificação através de microscopia eletrônica de varredura, como utilizado por Wu-Yuan et al. (1995) e Gatewood et al. (1993). Como nós utilizamos cultura para quantificar, a microscopia eletrônica de varredura, em nosso experimento, foi realizada apenas para ilustrar esta aderência.

O tempo de incubação dos microrganismos adotado neste experimento foi de 24 h. Diferentemente do trabalho de Wu-Yuan (1995) que utilizou tempo de 60 min. É bem verdade que este trabalho realizou a contagem através de microscopia eletrônica de varredura, método que exige uma menor quantidade de microrganismos aderidos para que se possa realizar a contagem. Em estudos como o de Pereira et al. (2007) e Romeiro et al. (2009), e em trabalhos preliminares observamos que o tempo utilizado por nós, associado a duas diluições seriadas, apresentavam resultados melhores no que diz respeito à contagem de UFC/ml.

A metodologia utilizada para mensuração do número de UFC/ml aderidas aos implantes é de simples execução e assemelha-se a utilizada por Imazato et al. em 2003 e Romeiro et al. em 2009. Os estudos

realizaram contagens de colônias em placas de Petri inoculadas em duplicata com diluições dos microrganismos. Após 48 h de incubação, a contagem das colônias formadas foi realizada nas placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

Apesar da diferença de métodos empregados em outros trabalhos, como o objetivo foi comparar aderência entre diferentes superfícies dentro da mesma metodologia, foi possível estabelecer um comparativo com nossos resultados.

Os resultados do presente estudo não demonstraram diferenças na aderência de microrganismos isolados e em biofilmes aos implantes controle e previamente embebidos em saliva e plasma humanos, contrariando resultados de outros estudos que destacaram a importância da película adquirida na aderência de microrganismos a superfícies bucais sólidas (Pratt-Terpstra et al., 1987; Wolinsky et al., 1989; Idone et al., 2003). Segundo Jendresen e Glantz (1981) os microrganismos reconhecem proteínas da película adquirida quando estas estão adsorvidas às superfícies e essa aderência é diferente para cada tipo de material e depende da rugosidade e energia livre de superfície. Provavelmente o titânio liso e com os três tratamentos de superfícies estudadas promoveram uma adsorção de proteínas da saliva e plasma humanos que não interferiram na aderência dos microrganismos.

S. sanguinis foi o microrganismo que apresentou as maiores médias de aderência no presente estudo. Estes dados foram comprovados pelo estudo de Hauser-Gerspach et al. (2007) que encontraram elevada quantidade de *S. sanguinis* aderido a superfície de implantes dentários e materiais restauradores em um modelo de aderência *in vitro*.

Quando em associação a outros microrganismos as médias apresentaram-se ainda maiores. Este ocorrido pode ser explicado pela metodologia aplicada neste trabalho para a contaminação dos implantes. Quando isoladamente, os microrganismos foram inoculados

juntamente com os corpos de prova por 24 h. A associação de microrganismos foi realizada, inoculando-os a cada 24 h, portanto, associado a um microrganismo, *S. sanguinis* permaneceu no meio de cultura por 48 h e associado a dois, por 72 h, situação na qual apresentou maior número de microrganismos aderidos. *C. albicans* também apresentou médias maiores quando permaneceu por 48 h no meio de cultura, entretanto as médias de aderência apresentaram-se menores que de *S. sanguinis* em todas as situações.

Analisando as diferenças de aderência nas diversas superfícies, este estudo demonstrou maior aderência de *S. sanguinis* aos implantes tratados por condicionamento com duplo ataque ácido e uma menor aderência aos implantes de superfície anodizada, ficando os implantes lisos e jateados com cerâmica de fosfato de cálcio em um nível intermediário de aderência. Este resultado demonstrou que nem sempre a superfície lisa apresenta menor aderência de microrganismos. Grossner-Schreiber et al. (2001) analisaram *in vitro* a formação de biofilme dentário sobre a superfície de implantes liso e tratados com deposição física de vapor, nitrato de titânio e nitrato de zircônia. Uma significativa diminuição na aderência de *S. sanguinis* foi verificada nas três superfícies tratadas quando comparadas com a superfície lisa. Grossner-Schreiber et al. (2004) analisando *in vivo* a formação de biofilme sobre essas mesmas superfícies, comprovaram a maior aderência a implantes lisos. Já Wu-Yuan et al. (1995) analisando a aderência de *S. sanguinis* em implantes lisos, rugosos e com ranhuras, demonstraram menor aderência em implantes de superfície lisa, porém esta análise foi realizada em microscopia eletrônica de varredura, onde os autores selecionaram 5 campos de cada amostra e realizaram a contagem.

As médias de aderência de *C. albicans* demonstrada no presente estudo, foram inferiores às dos outros microrganismos estudados. Estabelecendo um comparativo entre as superfícies, os grupos e as associações pode se verificar grande semelhança. Em três

situações não encontramos diferença significativa entre os resultados, *C. albicans* isolada e implante puro, associação de *S. sanguinis*, *S. mutans* e *C. albicans* na presença de saliva e *S. sanguinis*, *C. albicans* e *S. mutans* na presença de plasma humano. Nos demais experimentos os resultados alternaram-se, com maior aderência em implantes tratados com jateamento de cerâmica de fosfato de cálcio, seguido dos condicionados com duplo ataque ácido. Novamente os implantes submetidos a anodização apresentaram menor aderência. Em trabalho semelhante, Romeiro et al. (2009) não encontraram diferenças estatísticas entre a aderência de *C. albicans* a superfície de implantes lisa e tratadas com jateamento de óxido de titânio. O que comprova mais uma vez que a superfície lisa não é condição *sine qua non* para a manutenção da saúde periimplantar de implantes expostos ao meio bucal.

Segundo Chamberlain et al. (1992) a energia livre de superfície é diretamente proporcional a hidrofília da superfície e como a maioria dos microrganismos são hidrofílicos, uma aproximação a uma superfície hidrofílica é termodinamicamente desfavorável. Segundo Coutinho (2007) em trabalho avaliando a energia livre de superfície de implantes submetidos a tratamento de superfície com anodização e duplo ataque ácido comparando a implantes lisos verificou uma maior energia de superfície de implantes submetidos a anodização quando comparados às outras duas superfícies, que não apresentaram diferença estatística entre si. Portanto, a hidrofília da superfície anodizada pode explicar a menor aderência de microrganismo nesta superfície encontrada no presente trabalho.

Os fabricantes de implantes dentários desenvolveram tratamentos de superfícies com o intuito de aumentar a rugosidade dos implantes e, conseqüentemente, melhorar o contato com o osso durante a osseointegração. Dessa forma cada empresa apresenta uma superfície com tratamento peculiar. Sem análises específicas sobre a aderência de

microrganismos a essas superfícies, algumas empresas nacionais e internacionais, prevendo uma menor aderência em superfícies lisas, mantêm as primeiras roscas do implante sem tratamento. Após análises dos dados deste estudo e dos encontrados na literatura, parece claro que o método como é feito esse tratamento influencia, não só no potencial de osseointegração, mas também na aderência de microrganismos, que ocorrerá quando este implante estiver exposto ao meio bucal. Desta forma, na utilização clínica de implantes deve-se levar em conta não apenas estudos que mostram sua capacidade de osseointegração, mas também sua suscetibilidade a aderência de microrganismo, principalmente os pioneiros na formação do biofilme que servirão de alicerce para a colonização de microrganismos patogênicos ao tecido periimplantar.

7 CONCLUSÃO

A partir da metodologia empregada, os resultados permitem concluir que:

- a) A aderência dos microrganismos não foi influenciada pela presença ou ausência de saliva e plasma humanos interpostos;
- b) *S. sanguinis* apresentou grande aderência às superfícies de titânio lisa e tratadas com anodização, jateamento de cerâmica de fosfato de cálcio e duplo ataque ácido;
- c) A superfície anodizada demonstrou menor aderência dos microrganismos e associações estudadas;
- d) A superfície condicionada com duplo ataque ácido apresentou maior aderência de *S. sanguinis*;
- e) A superfície lisa apresentou resultados intermediários de aderência em todos os grupos.

8 REFERÊNCIAS*

Aalam AA, Nowzari H. Clinical evaluation of dental implants with surfaces roughened by anodic oxidation, dual acid-etched implants, and machined implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Sep-Oct;20(5):793-8.

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.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986;1:11-25.

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int J Prosthodont*. 2004 Sep-Oct;17(5):544-64.

Al-nawas B, Hangen U, Duschner H, Krummenauer F, Wagner W. Turned, machined versus double-etched dental implants in vivo. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007;9(2):71-8.

Alves SH, de Loreto ES, Linares CE, Silveira CP, Scheid LA, Pereira DI, Santuario JM. Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006 May-Jun;48(3):119-21.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res.* 1989 Mar;24(2):96-105.

Arendorf TM, Walker, DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 1980;25:1-10.

Branting S, Sund ML, Linder, LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 1989;34:347-53.

Busscher HJ, Van Der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* 1997 Apr;11(1):24-32

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun.* 2000;68(7):4018- 23.

Candido MSM, Pizzolitto AC, Bandeira MFCL, Santana SL, Bordin MM. Ação antibacteriana de diferentes materiais restauradores. *J Bras Clin Estet Odontol*, 2000;4:49-52.

Chamberlain AHL. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher B, Capdeville B, editors. *Biofilms-Science and Technology*. Dordrecht: Kluwer academic publishers; 1992. p. 59-67.

Cochram DL, Simpson J, Weber HP, Buser D. Attachment and Growth of Periodontal Cells on Smooth and Rough Titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(3):289–97

Coutinho MP, Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia – IME; 2007.

Curtiss R 3rd. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence and prospects for an anticaries vaccine. J Dent Res. 1986 Aug;65(8):1034-45.

Daley TD, Gibson D. Practical applications of energy dispersive X-ray microanalysis in diagnostic oral pathology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990;69:339-44.

Davies JED. Mechanisms of endosseous integration. Int J Prosthodont. 1998;11:391-401.

Devides SL, Franco AT. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported prostheses submitted to immediate load. Int J Oral Maxillofac Implants. 2006 Mar-Apr;21(2):262-9.

Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. J Oral Rehabil. 2004; Mar;31(3):278-85.

Featherstone, J.D. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. Dent Mater. 1996 May;12(3):194-7.

Fujioka-hirai Y, Akagawa Y, Minagi S, Tsuru H. Adherence of *Streptococcus mutans* to implant materials. J Biomed Res. 1987;21(7):913-21.

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.

Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implants surface. Clin Oral Impl Res. 1993;4:53-64.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan;13(1):122-43

Gonshor A, Goveia G, Sotirakis E. A prospective, multicenter, 4-year study of the ACE surgical resorbable blast media implant. J Oral Implantol. 2003;29(4):174-80.

Grössner-schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H, et al.. Plaque formation on surface modified dental implants. An *in vitro* study. Clin Oral Impl. Res. 2001;12:543-51.

Grössner-schreiber B, Hannig M, Duck A, Grietentrog M, Wenderoth DF. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? Eur J Oral Sci. 2004;112:516-22.

Gibbons RJ, Nygaard M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. Arch Oral Biol. 1968;13:1249-62.

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res. 1989 May;68(5):750-60.

Guggenheim B, Giertsen E, Shupbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. J Dent Res. 2001 Jan;80(1):363-70.

Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials *in vitro*. Dent Mater J. 2007; 26(3):361-6.

Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. Mycoses. 2007; 50(5):391-6.

Henry P, Lindén B, Naert I, Weber H, Bergström C, Jemt T. Removal torque comparison of TiUnite and turned implants in the greyhound dog mandibule. *Appl Osseointegr Res*. 2000;1:15-7.

Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M, et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehabil*. 2007 May;34(5):377-82.

Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*. 1995;63:1827-34.

Idone V, Brendtro S, Gillespie R, Kocaj S, Peterson E, Rendi M, et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infect Immun*. 2003;71:4351-60.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater*. 2003 Sep;19(6):449-57.

Jansson H, Hamberg K, De Bruyn H, Bratthall G. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005;7(1):51-9.

Jendresen MD, Glantz PO. Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in-vivo study. *Acta Odontol Scand*. 1981;39(1):39-45.

Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. 3.ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 2007.

Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J, Senpuku H. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary componets. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:220-5.

Khang W, Feldman S, Hawley CE, Gunsolley J. A multi-center study comparing dual acid-etched and machined-surfaced implants in various bone qualities. *J Periodontol*. 2001 Oct;72(10):1384-90.

Lacaz CS. Tratado de micologia médica. 9, ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

Lazzara RJ, Testori T, Trisi P, Porter SS, Weinstein RL. A human histologic analysis of osseotite and machined surfaces using implants with 2 opposing surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999 Apr;19(2):117-29.

Leitão JA, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, Sendyk WR. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR). *Braz Oral Res*. 2005 Jan-Mar;19(1):52-7.

Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implant Res*. 1999;10:339-45.

Liljemark WF, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):180-98.

Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of periimplant and periodontal tissues: a study in the beagle dog. *Clin Oral Implant Res*. 1992; 3:9-13.

Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):431-7.

Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000. 1994 Jun; 5: 52-65.

López NJ, Smith PC, Gutierrez J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2002;73(8):911-24.

Marcacci S, et al. Aderência de *Candida albicans* em ligas de titânio e cromo-cobalto, com diferentes desgastes. Rev Sul-bras Odont. 2008;5(1):7-12.

Migliorati CA, Birman EG, Cury AE. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Sep;98(3):301-10.

Mombelli A, Lang N. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. Periodontology 2000. 1998;17:63-76.

Mombelli A. Microbiology of dental implant. Adv Dent Res. 1993; 7: 202-6.

Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987 Dec;2(4):145-51.

Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. *In vivo* plaque formation on implant materials. Int J Oral Maxillofac Implants. 1989;4:321-6.

Nassar U, Meyer AE, Ogle RE, Baier RE. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. Periodontol 2000. 1995 Jun;8:114-20.

Newman MG, Flemming TF. Periodonal considerations of implants and implant associated microbiota. J Dent Educ. 1988;52:737-44.

Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses. 2001 Nov.;(9/10):361-7.

Nikawa H, Egusa H, Makihiro S, Nishimura M, Ishida K, Furukawa M, et al. *In vitro* cariogenic potencial of *Candida albicans*. Mycoses. 2003;46:471-8.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A. The effect of saliva and serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxyapatite beads. J Dentistry. 1998;26:31-7.

Okte E, Sultan N, Doğan B, Asikainen S. Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. J Periodontol. 1999 Nov;70(11):1376-82.

Oliveira MA, Carvalho LP, Gomes Mde S, Bacellar O, Barros TF, Carvalho EM. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. Microbiol Immunol. 2007;51(8):713-9.

Ong ES, Newman HN, Wilson M, Bulman JS. The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants. J Periodontol. 1992;63:200-5.

Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Eur J Oral Sci. 2006;114(4):343-8.

Pereira T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. Int J Prosthodont. 2007;20(3):308-10.

Persson GR, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (Arestin) in the treatment of peri-implantitis. I: Microbiological outcomes. Clin Oral Implants Res. 2006 Aug;17(4):386-93.

Pin ML, Abdo RC, Machado MA, da Silva RM, Pavarini A, Marta RN *In vitro* evaluation of cariostatic action of esthetic restorative materials in bovine teeth under severe cariogenic challenge. Oper Dent. 2005;30:368-75.

Pires M FC, Correa B, Gambale W, Paula R. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence *in vitro*. Braz J Microb. 2001;32:157-2.

Pongnarisorn NJ, Gemmell E, Tan AE, Henry PJ, Marshall RI, Seymour GJ. Inflammation associated with implants with different surface types. Clin Oral Implants Res. 2007 Feb;18(1):114-25.

Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. Adhesion of oral streptococci from flowing suspension to uncoated and albumincoated surfaces. J Gen Microbiol. 1987;133:3199-206.

Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface free-energy on supra- and subgingival plaque formation in man. J Clin Periodontol. 1995;22(1):1-14.

Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. Clin Oral Implants Res. 1990 Dec;1(1):8-12.

Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe D. Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. J Periodontol. 1996 Oct;67(10):986-93.

Radford D R, Sweet S P, Challacombe S J, Walter J D. Adherence of *Candida albicans* to denture-base with different surface finishes. J Dent. 1998;26:577-83.

Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microflora associated with dental implants. J Prosthet Dent. 1984;51:529-34.

Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. *In vivo* early plaque formation in pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. Clin Oral Implant Res. 1998;9:357-64.

Razak FA, Rahim ZH. The anti-adherence effect of *Piper betle* and *Psidium guajava* extracts on the adhesion of early settlers in dental plaque to saliva-coated glass surfaces. J Oral Sci. 2003;45(4):201-6.

Rimondini L, Farè S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. J Periodontol. 1997 Jun;68(6):556-62.

Rocci A, Martignoni M, Sennerby L, Gottlow J. Immediate loading of a Branemark implant system with the TiUnite surface. Histological evaluation after 9 months. Appl. Osseointegr Res. 2002;3:25-8.

Romeiro RL, Majewski M, Molina FP, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* à superfície de implantes lisos e rugosos. Rev Implantnews. 2009;6(1):33-7.

Rozen R, Steinberg D, Bachrach G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. FEMS Microbiol Lett. 2004 Mar;232(1):39-43.

Ruona K, Maxson BB, Syed S. *In vitro* adherence of bacteria to two implant materials. J Dent Res. 1991;70:477-83.

Sardin S, Morrier JJ, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions physicochemical surface properties. J Oral Rehabil. 2004;31(2):140-8.

Segal E, Trygeman O, Gov H, Sandovsky H L, Berdicevsky. Adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells: effects of antimycotics. J Mycol Med. 1997;7:71-6.

Sen BH, Kamran ES, Larz SW. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1997;84:68-73.

Sennerby L, Miyamoto I. Insertion torque and RFA analysis of TiUnite and SLA implants. A study in the rabbit. Appl Osseoint Res. 2000;1:31-3.

Shibli JA, Martins MC, Lotufo RF, Marcantonio E Jr. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):383-90.

Shibli JA, Vitussi TR, Garcia RV, Zenóbio EG, Ota-Tsuzuki C, Cassoni A, et al. Implant surface analysis and microbiologic evaluation of failed implants retrieved from smokers. *J Oral Implantol*. 2007;33(4):232-8.

Silva CHFP, Figueiredo CH, Vidigal GM, Uzeda M, Soares GA. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: An *in vitro* study. *Implant Dent*. 2005;14:88-93.

Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J. Dent*. 2001;30(7-8):383-5.

Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol scan*. 1990 Feb.;48(1):3-10.

Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparasion of the epidemiology, drug resistance machanisms and virulence of *Candida dublinienses* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2004;4(4-5):369-76.

Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Sep-Oct;17(5):696-702.

Tamesada M, Kawabata S, Fujiwara T, Hamada S. Synergistic effects of streptococcal glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. *J Dent Res*. 2004 Nov;83(11):874-9.

Tonetti MS, Schmid J. Pathogenesis of implant failures. *Periodontol* 2000. 1994 Feb;4:127-38.

Tsang CSP, McMillan AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. Clin Oral Invest. 2007;11:361-8.

Walker C, Sedlacek MJ. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. Oral microbiol Immunol. 1999;22(3):152-61.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998 Aug;43(4):244-9.

Weng D, Hoffmeyer M, Hürzeler MB, Richter EJ. Osseotite vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. Clin Oral Implants Res. 2003 Dec;14(6):703-8.

Wolinsky LE, Decamargo PM, Erad JC, Newman MG. A study of in vivo attachment of *Streptococcus sanguis* to titanium. Int J Oral Maxillofac Implants. 1989;4:27-31.

Won M, Mehta MP, Curran WJ, Souhami L, Michalski JM, Rogers CL, et al. An experimental study of newly designed implant with RBM surface in the rabbit tibia: resonance frequency analysis and removal torque study. J Korean Acad Prosthodont. 2003;41(6):720-31.

Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, Walters KS. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. J Oral Implantol. 1995;21(3):207-13.

APÊNDICE A: Resultados do logarítimo de UFC/ml, médias e desvios padrões dos microrganismos isolados e em associações, de implantes com diferentes tratamentos de superfície, com e sem imersão em saliva e plasma humanos.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Leoni, 777 - Jd. São Ovídio
Cidade de São José dos Campos - SP, 12231-978 - Fone: (12) 7947-0028
Fax: (12) 7947-0010 / e-mail: suely@fop.usp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 05/2008-PH/CEP, sobre
"Aderência *in vitro* de *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus*
mutans e *Candida albicans* em implantes dentários de superfície lisa
ou tratada" sob a responsabilidade de **ANTONIO OLAVO CARDOSO**
JORGE, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e
normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres
humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde
e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 28 de março de 2008.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Romeiro RL. Adherence in vitro of Streptococcus sanguinis and Candida albicans in dental implants of surface smooth or treated [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The aim of this study has been to analyze, in vitro the adherence of Streptococcus sanguinis, Candida albicans and associations of those microorganisms with Streptococcus mutans to the surfaces of dental implants treated with calcium phosphate jetting, anodization, double acid attack and to those of smooth surface, with or without previous saliva or blood plasma incubation. Ten implants from each surface were selected for every studied microorganism and association. In order to analyze the adherence, suspensions of microorganisms bearing 10^6 viable cells/ml in spectrophotometer were prepared. Additionally, every microorganism and association was divided in three groups: in the first, an implant was removed from its wrap and put right away into the sauce; the second, it was previously drenched into saliva for one hour; and the last one, into plasma, for one hour, as well. The implants were separately placed in culturing plaque wells of cells containing saccharose sauce (in vitro plaque) and the microorganism's suspension. After 24 hours of incubation time at 37 °C and 5% of CO₂, the implants were taken washed three times for a minute in saline sterile solution and put in a sonicator holding 10 ml of saline in order to disperse adherent cells. Then, seriated dilutions were

done, and sowing in culture media specific for each of the. After a 48h-incubation time at 37°C and 5% of CO₂, a counting was carried, of the colony forming units (UFC/ml) and the data were submitted to the ANOVA, Tukey test, at a significance level of 5%. To illustrate the adherence of the microorganisms, some samples were exposed to electronic sweeping microscopy. The results did show great microorganism adherence to the surfaces studied, mainly when associated forming a biofilm. The anodized surface presented the smallest adherence figures from the two microorganisms, within the three groups and four surfaces studied. *S. sanguinis* showed the greatest adherence on implants that had their surface treated with double acid attack and *C. albicans* presented the greatest UFC/ml figures on jetted surfaces. The presence of interposed fluids as human saliva or plasma did not interfere in that adherence. The adherence of microorganisms to dental implants seems to be dependent on the type of surface.

Keywords: Dental implantation. Candida albicans. Streptococcus mutans. Streptococcus sanguinis.