

UNIVERSIDADE PAULISTA

**DIFERENÇAS NO MICROBIOMA SUBGENGIVAL DE
IMPLANTES SAUDÁVEIS E DE IMPLANTES
COM PERI-IMPLANTITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

PEDRO H. F. DENÓFRIO

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE PAULISTA

**DIFERENÇAS NO MICROBIOMA SUBGENGIVAL DE
IMPLANTES SAUDÁVEIS E DE IMPLANTES
COM PERI-IMPLANTITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano R. Cirano

PEDRO H. F. DENÓFRIO

SÃO PAULO

2023

Denófrio, Pedro Henrique Faria.

Diferenças no microbioma subgengival de implantes saudáveis e de implantes com peri-implantite / Pedro Henrique Faria Denófrio. - 2023.

12 f. : il.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Ribeiro Cirano.

Coorientadora: Mabelle de Freitas Monteiro.

1. Peri-implantite. 2. Microbioma. 3. Implantes. I. Cirano, Fabiano Ribeiro (orientador). II. Monteiro, Mabelle de Freitas (coorientadora). III. Título.

PEDRO H. F. DENÓFRIO

**DIFERENÇAS NO MICROBIOMA SUBGENGIVAL DE
IMPLANTES SAUDÁVEIS E DE IMPLANTES
COM PERI-IMPLANTITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

_____/ /
Prof. Dr. Fabiano R. Cirano

_____/ /
Prof.^a Dr.^a Mabelle de Freitas Monteiro

_____/ /
Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

_____/ /
Prof.^a Dr.^a Karina Villalpando Teixeira

_____/ /
Prof.^a Dr.^a Daiane Cristina Peruzzo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, exemplo de perseverança e resiliência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por nunca me abandonar em minha jornada.

Agradeço à Universidade Paulista Unip, por me dar a oportunidade de realizar este doutorado.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Allegetti, por me incentivar nesta empreitada e apoiar, de todas as maneiras possíveis, para executar este trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcio Z. Casati, que, com sua genialidade ímpar, consegue criar trabalhos fantásticos e inspirar uma equipe toda.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fabiano R. Cirano, que executou um papel paterno na orientação, tanto deste trabalho, quanto em minha formação como profissional.

Agradeço à equipe de Periodontia, por toda paciência e prontidão, sempre lá para tudo.

Agradeço a todos os meus colegas de doutorado, pois, tendo eles ao meu lado, essa jornada foi muito mais fácil, tornando-a, em muitos momentos, alegre e divertida.

Agradeço a todos os alunos da iniciação científica, pelos dias duros nos experimentos.

Agradeço aos meus colegas professores do Curso Preparatório para residências e especialização de Cirurgia Bucomaxilofacial do SOESP, por participarem do meu sonho de formar novos cirurgiões.

Agradeço à primeira turma de especialização do Soesp, por confiar em mim a sua formação.

Agradeço a todos de minha equipe do Hospital Samaritano Higienópolis, por estarem para mim muito mais como colegas de trabalho, e sim como parte de mim, alegrando-se junto, sofrendo junto e passando por todos os limites, para que pudéssemos manter a nossa excelência.

Agradeço à minha família, pela paciência nos momentos de estresse e ausência, principalmente ao meu filho, que sempre que pôde, corria para me dizer “bom trabalho, papai”.

Agradeço à minha esposa Karina Carmes, pelo carinho, compreensão e apoio.

Agradeço aos funcionários da Universidade Paulista, por todos os auxílios.

Agradeço aos meus pacientes.

RESUMO

Peri-implantite é uma doença inflamatória caracterizada pela perda óssea patológica e progressiva ao redor dos implantes. Ela apresenta como fator etiológico o biofilme bacteriano acumulado ao redor dos implantes. Sugere-se que um processo de disbiose e consequente desequilíbrio na homeostase nos tecidos peri-implantares esteja associado com seu início. O objetivo deste estudo foi investigar as diferenças no biofilme peri-implantar em implantes com saúde e com peri-implantite. Foram selecionados pacientes com implantes saudáveis (n=15) e pacientes com peri-implantite (n=18). Biofilme da região submucosa foi coletado com cones de papel absorvente. O DNA bacteriano foi extraído e a região 16S rRNA foi sequenciada utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Os dados foram analisados utilizando ferramentas de bioinformática. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a diversidade alfa pela métrica de Shannon ($p>0,05$). Entretanto, observou-se diferenças marcantes na diversidade beta (métrica Bray-Curtis), e sítios com saúde peri-implantar e peri-implantite apresentaram comunidades microbianas distintas ($p<0,05$). Adicionalmente, 51 espécies foram diferencialmente abundantes entre os grupos ($p<0,05$), sendo 24 delas mais abundantes em implantes doentes, entre elas *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus* spp. Em conclusão, implantes com saúde peri-implantar ou com peri-implantite apresentam comunidades microbianas distintas, sendo que espécies mais patogênicas foram identificadas na peri-implantite.

Palavras-chave: Peri-implantite; Microbioma; Implantes; Disbiose.

ABSTRACT

Peri-implantitis is an inflammatory disease characterized by pathological and progressive bone loss around implants. It presents as an etiological factor the bacterial biofilm accumulated around the implants. It is suggested that a process of dysbiosis and consequent imbalance in homeostasis in peri-implant tissues is associated with its onset. The aim of this study was to investigate the differences in peri-implant biofilm in healthy and peri-implantitis implants. Patients with healthy implants (n=15) and patients with peri-implantitis (n=18) were selected. Biofilm from the submucosal region was collected with absorbent paper cones. Bacterial DNA was extracted and the 16S rRNA region was sequenced using the Illumina MiSeq platform. Data were analyzed using bioinformatics tools. No statistically significant difference was observed between groups for alpha diversity by the Shannon metric ($p>0.05$). However, there were marked differences in beta diversity (Bray-Curtis metric), and sites with peri-implant health and peri-implantitis had distinct microbial communities ($p<0.05$). Additionally, 51 species were differentially abundant between groups ($p<0.05$), 24 of which were more abundant in diseased implants, including *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus spp.* In conclusion, implants with peri-implant health or with peri-implantitis present distinct microbial communities, and more pathogenic species were identified in peri-implantitis.

Key-words: Peri-implantitis; Implants; Biome; Dysbiosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	CONCLUSÃO GERAL	10
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	11

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentais é fundamental para a reposição de dentes perdidos, sendo utilizados em inúmeros protocolos de reabilitação dental (Adell et al., 1981; Jemt; Johansson, 2006). Além da versatilidade de sua utilização, o tratamento com implantes apresenta uma alta taxa de sucesso (90 a 99%) e de sobrevida (10 a 15 anos). Estudos estimam que pelo menos 100 milhões de pessoas ao redor do mundo (Lekholm et al., 1999) realizaram tratamento com implantes dentários, permitindo o restabelecimento de função, fonética e estética nos pacientes e, consequentemente, aumentando a qualidade de vida da população (Meijer; Raghoobar; Van't Hof, 2003; Nowjack-Raymer; Sheiham, 2003; Rashid et al., 2011; Timmerman et al., 2004). Apesar de todos os benefícios da reabilitação com implantes, esta pode ser associada com complicações biológicas tardias, mesmo após o sucesso da osseointegração, que afetam de maneira importante a longevidade do tratamento. Como exemplo, pode-se citar as doenças peri-implantares de origem inflamatória, como a mucosite e a peri-implantite.

A saúde peri-implantar é caracterizada pela ausência de eritema, sangramento à sondagem, edema e supuração. Não é possível definir uma gama de profundidades de sondagem compatíveis com a saúde. A saúde peri-implantar pode existir em torno de implantes com suporte ósseo reduzido (Berglundh et al., 2018).

A principal característica clínica da mucosite peri-implantar é o sangramento à sondagem suave. Eritema, edema e/ou supuração também podem estar presentes. Um aumento na profundidade de sondagem é frequentemente observado na presença de mucosite peri-implantar, devido ao inchaço ou à diminuição da resistência à sondagem. Há fortes evidências de estudos experimentais em animais e humanos de que a placa é o fator etiológico da mucosite peri-implantar (Berglundh et al., 2018).

A peri-implantite é uma condição patológica associada à placa que ocorre nos tecidos ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação na mucosa peri-implantar e subsequente perda progressiva do osso de suporte. Os locais de peri-implantite exibem sinais clínicos de inflamação, sangramento à sondagem e/ou supuração, profundidade de sondagem aumentada e/ou recessão da margem da mucosa, além de perda óssea radiográfica (Berglundh et al., 2018).

Alterações ecológicas nos locais submucosos peri-implantares podem levar a mudanças no microbioma, proporcionando condições favoráveis para o supercrescimento de bactérias potencialmente patogênicas (disbiose), aumentando, assim, as chances do hospedeiro

desenvolver peri-implantite (Kröger et al., 2018). Desta maneira, a disbiose estaria associada a uma quebra da homeostase entre agressões do biofilme e à resposta do hospedeiro nos tecidos peri-implantares (Berbel et al., 2019), que teria como consequência um colapso nos tecidos peri-implantares, além da perda óssea.

Estudos iniciais avaliando a microbiota da peri-implantite, comparada a implantes saudáveis ou periodontite, tiveram dificuldades em identificar diferenças em patógenos específicos entre sítios e perfis de doença (Meffert, 1996). Entretanto, a utilização de sequenciamento de DNA e RNA e de ferramentas de bioinformática conseguiu identificar algumas alterações na composição do biofilme e no seu funcionamento (Belibasakis; Manoil, 2021; Sousa et al., 2022). Zheng et al. (2015), por exemplo, encontraram alterações na co-ocorrência dos patógenos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia* na peri-implantite, enquanto Barbagallo et al. (2021) descreveram diferenças em outros gêneros menos investigados. Alterações no perfil transcriptômico bacteriano e dos pacientes nos sítios com peri-implantite, quando comparadas a implantes saudáveis, também já foram descritas (Ganesan et al., 2022).

Compreender como a composição da microbiota se altera em um estado de saúde ou de doença e como ocorre esta transição é fundamental para enfrentar o problema da peri-implantite, além de identificar biomarcadores para doença e determinar abordagens terapêuticas mais específicas e eficientes. Assim, o objetivo do presente estudo será investigar as diferenças no biofilme peri-implantar em implantes doentes e com peri-implantite, utilizando o sequenciamento do DNA bacteriano e ferramentas de bioinformático.

2 CONCLUSÃO GERAL

Implantes com peri-implantite ou com saúde peri-implantar apresentam diferenças marcantes na comunidade microbiana peri-implantar. Apesar de não apresentarem diferenças na diversidade alfa, foi observado que implantes com peri-implantite apresentaram diversidade beta distinta de implantes saudáveis, com a presença de uma microbiota disbiótica e com maior abundância de microrganismos, como *F. alocis*, *P. gingivalis*, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp. e *Staphylococcus* spp. O que demonstra a necessidade de novos estudos para aumentarmos cada vez mais o conhecimento sobre este tipo de colonização peri implantar.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- 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 Jan;10(6):387–416.
- Barbagallo G, Santagati M, Guni A, Torrisi P, Spitale A, Stefani S, et al. Microbiome differences in periodontal, peri-implant, and healthy sites: a cross-sectional pilot study. *Clin Oral Investig*. 2021 Nov 26; 26(3):2771-81.
- Belibasakis GN, Manoil D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *J Dent Res*. 2021 Jan;100(1):21-8.
- Berbel LO, Banczek EP, Karoussis IK, Kotsakis GA, Costa I. Correction: Determinants of corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy dental implants in an In Vitro model of peri-implant inflammation. *PLoS One*. 2019 May 28;14(5):e0217671.
- Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45(20):S286–91.
- Ganesan SM, Dabdoub SM, Nagaraja HN, Mariotti AJ, Ludden CW, Kumar PS. Biome-microbiome interactions in peri-implantitis: A pilot investigation. *J Periodontol* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2022 Dec 13];93(6):814–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35073418/>
- Jemt T, Johansson J. Implant Treatment in the Edentulous Maxillae: A 15-Year Follow-Up Study on 76 Consecutive Patients Provided with Fixed Prostheses. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2006 Jun;8(2):61–9.
- Kröger A, Hülsmann C, Fickl S, Spinell T, Hüttig F, Kaufmann F, et al. The severity of human peri-implantitis lesions correlates with the level of submucosal microbial dysbiosis. *J Clin Periodontol*. 2018 Dec;45(12):1498-1509.
- Lekholm U, Wannfors K, Isaksson S, Adielsson B. Oral implants in combination with bone grafts. A 3-year retrospective multicenter study using the Brånemark implant system. *Int J Oral Maxillofac Surg*. [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2022 Dec 13];28(3):181–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10355938/>
- Meffert RM. Periodontitis vs. Peri-Implantitis: The Same Disease? The Same Treatment? *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996 Jul;7(3):278–91.
- Meijer HJA, Raghoobar GM, Van't Hof MA. Comparison of implant-retained mandibular overdentures and conventional complete dentures: a 10-year prospective study of clinical aspects and patient satisfaction. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2003 [cited 2022 Dec 13];18(6):879–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14696664/>

Nowjack-Raymer RE, Sheiham A. Association of edentulism and diet and nutrition in US adults. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):123-6.

Rashid F, Awad MA, Thomason JM, Piovano A, Spielberg GP, Scilingo E, et al. The effectiveness of 2-implant overdentures - a pragmatic international multicentre study. *J Oral Rehabil* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2022 Dec 13];38(3):176–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20704639/>

Sousa V, Spratt D, Davrandi M, Mardas N, Beltrán V, Donos N. Oral Microcosm Biofilms Grown under Conditions Progressing from Peri-Implant Health, Peri-Implant Mucositis, and Peri-Implantitis. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022 Oct 28 [cited 2022 Dec 13];19(21):14088. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36360970/>

Timmerman R, Stoker GT, Wismeijer D, Oosterveld P, Vermeeren JIJF, van Waas MAJ. An Eight-year Follow-up to a Randomized Clinical Trial of Participant Satisfaction with Three Types of Mandibular Implant-retained Overdentures. *J Dent Res*. 2004 Aug;83(8):630–3.

Zheng H, Xu L, Wang Z, Li L, Zhang J, Zhang Q, et al. Subgingival microbiome in patients with healthy and ailing dental implants. *Sci Rep*. 2015 Jun 16;5(1):10948.