

# Ocorrência dos patógenos do complexo vermelho em sítios periodontais e periimplantares nas mesmas bocas

*Occurrence of pathogens of the red complex in periodontal and peri-implant sites of the same mouths*

Nilson Roberto Armentano\*  
 José Luiz De Lorenzo\*\*  
 Mario Julio Avila-Campos\*\*\*  
 Wilson Roberto Sendyk\*\*\*\*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), dirigida para as espécies do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*), a ocorrência semiquantitativa desses patógenos em sulcos gengivais-controle (SG-C), bolsas periodontais (BP) e sulcos periimplantares (SPI) de cinco pacientes parcialmente desdentados portadores de implantes dentários havia mais de dois anos. Nos SG-C de três pacientes foi detectado o DNA de *P. gingivalis*, em um deles juntamente com o de *T. forsythensis*. Nas BP de todos, além de *T. forsythensis* e/ou *T. denticola*, foi constatada maior frequência de *P. gingivalis* e a relação desses patógenos com a profundidade e o sangramento à sondagem. Apesar da presença em sítios periodontais, nenhuma das espécies-alvo foi identificada nos SPI, embora quatro apresentassem sangramento à sondagem. Nossos resultados, obtidos em SPI sem periimplantite, confirmam que o método PCR possibilita um diagnóstico aplicável na análise de risco de doença, pois os patógenos da BP podem se translocar para os SPI, obrigando a um maior rigor no controle do biofilme dental.

**Unitermos** - Implantes dentários; *Porphyromonas gingivalis*; *Tannerella forsythensis*; *Treponema denticola*; Complexo vermelho; Reação em cadeia da polimerase.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, by polymerase chain reaction (PCR) directed for the species of the red complex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*), the semiquantitative occurrence of these pathogens in control-gingival crevices (C-GC), periodontal pockets (PP) and peri-implant sulcus (P-IS) of five partially edentulous patients who have had one or more dental implants for over two years. In C-GC of three patients was detected the presence of ADN of *P. gingivalis*, together with *T. forsythensis* in one of them. In all PP, besides *T. forsythensis* and/or *T. denticola* was evidenced higher frequency of *P. gingivalis* and relation of these pathogens with probing depth and bleeding on probing. Despite the presence in periodontal sites, no DNA, from any target specie, was found in P-IS, even so four presented bleeding on probing. Our results, gotten in PI-S without peri-implantitis, in such a way confirm that PCR method is of great value, making possible an applicable diagnosis for the analysis of disease risk, because the pathogens of PP can translocate to the PI-S, leading to the need of more rigorous control of dental biofilm.

**Key Words** - Dental implants; *Porphyromonas gingivalis*; *Tannerella forsythensis*; *Treponema denticola*; Red complex; Polymerase chain reaction.

Recebido em: mai/2006  
 Aprovado em: set/2006

\*Professor adjunto da Disciplina de Periodontia e Implantodontia da Universidade de Santo Amaro – Unisa/SP.

\*\*Professor doutor aposentado do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

\*\*\*Professor associado do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

\*\*\*\*Coordenador do Mestrado em Implantodontia da Universidade de Santo Amaro – Unisa/SP.

## Introdução

Apesar do alto índice de sucesso alcançado com a utilização de implantes osseointegráveis para repor dentes perdidos e devolver melhor forma e função ao sistema estomatognático, ainda ocorrem alguns insucessos. Estes casos estão relacionados com o trauma cirúrgico (incluindo falha no controle da temperatura), quantidade e qualidade óssea inadequadas, sobrecarga oclusal, parafunções e, na maioria dos casos, acúmulo de biofilme patogênico<sup>3</sup>.

Existe grande semelhança na microbiota associada a dentes naturais e aos implantes colocados em pacientes parcialmente desdentados. Na condição de saúde ocorre predominância de cocos e bacilos Gram-positivos anaeróbios *facultativos sacarolíticos e imóveis*, enquanto na doença periodontal e periimplantar predominam espécies proteolíticas de bacilos Gram-negativos anaeróbios *estrictos e espiroquetas*<sup>21,22,24</sup>. Essa sucessão bacteriana ocorre em função do aumento do fluxo de exsudato sulcular, que acarreta aumento do nível local de proteínas, favorecendo o maior desenvolvimento de espécies predominantemente proteolíticas e dependentes de fatores nutritivos encontrados em hemoderivados como o exsudato sulcular<sup>5</sup>. Por outro lado, com a migração apical do epitélio juncional, aumenta a condição de anaerobiose<sup>6,8</sup>. Essas alterações ambientais rompem o equilíbrio do ecossistema subgingival<sup>18</sup>, possibilitando a sucessão bacteriana e a instalação de patógenos no biofilme, condição que favorece o início e a progressão da doença<sup>6,18</sup>. A instalação de patógenos específicos também é favorecida pela prévia colonização de algumas espécies bacterianas que alteram as condições ambientais originais do biofilme<sup>9,15,27</sup>.

Bolsas periodontais e superfícies mucosas são reservatórios de bactérias que podem colonizar sítios periimplantares na mesma boca (conceito da translocação bacteriana).

Dentre as bactérias reconhecidas pelo *World Workshop of Periodontology* (1996) como associadas com a periodontite crônica, merecem destaque as anaeróbias estritas e proteolíticas que compõem a associação que Socransky et al<sup>27</sup> (2000) viriam a denominar de "complexo vermelho": *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (em 2002 reclassificada como *Tannerella forsythensis*) e *Treponema denticola*. Essas espécies distinguem-se pela produção de importantes fatores de virulência como enzimas histolíticas (principalmente as proteases), toxinas citotóxicas (principalmente as endotoxinas) e fatores de evasão às defesas do hospedeiro<sup>5</sup>.

*P. gingivalis* e *T. forsythensis* apresentam desenvolvimento bastante lento em meios de cultivo e *T. denticola* é muito sensível a pequenos teores de oxigênio e dificilmente cultivável. A partir da década de 1990, os métodos moleculares de identificação microbiana, como o PCR, dotados de alta sensibilidade e especificidade<sup>30</sup>, trouxeram maiores

e mais rápidas possibilidades de detecção, particularmente de *T. denticola*, em materiais clínicos, pois conseguem evidenciar mínimas quantidades de DNA de microorganismos, mesmo que eles não estejam mais viáveis<sup>17</sup>.

## Materiais e Método

Neste estudo foram analisados cinco pacientes parcialmente desdentados, com idades entre 34 e 68 anos, portadores de um ou mais implantes de hexágono externo tipo Brånemark, com diâmetro de 3,75 mm e em função havia mais de dois anos e pelo menos uma bolsa periodontal com profundidade maior ou igual a 5 mm e um ou mais dentes com saúde periodontal. Todos apresentavam boas condições sistêmicas e não tinham recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses ou antibioticoterapia nos três meses que antecederam o estudo.

No exame clínico foi observada a presença ou ausência de sangramento à sondagem, utilizando sondas milimetradas de aço<sup>§</sup> (sítios periodontais) e de teflon<sup>¶</sup> (sítios periimplantares). De cada paciente foram selecionados três sítios para coleta de material: um sulco gengival saudável com profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm (controle), uma bolsa periodontal com profundidade à sondagem de no mínimo 5 mm e um sulco periimplantar sem periimplantite.

Após a remoção do biofilme supragengival com hastes flexíveis com algodão, a coleta de material foi realizada inserindo, por um minuto, dois cones esterilizados de papel absorvente tamanhos 35 e 40<sup>¶</sup> no interior dos sítios periodontais e periimplantares<sup>3</sup>. Os cones foram colocados no interior de um tubo eppendorf contendo 300 µl de Água ultrapura Milli-Q<sup>¶</sup> esterilizada e transportados imediatamente para o laboratório, onde as amostras foram diluídas até 10<sup>-10</sup> e os DNA bacterianos extraídos por fervura a 100°C durante 15 minutos<sup>2</sup>. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 G durante dez minutos e o sobrenadante (DNA) foi utilizado imediatamente ou estocado a -20°C.

A amplificação dos DNAs bacterianos foi realizada em volumes finais de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão PCR (10 x)<sup>¶</sup>, 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM)<sup>¶</sup>, 1,0 µl da mistura de dNTP<sup>¶</sup> (0,2 uM), 1,0 µl de cada iniciador específico<sup>¶</sup> (0,4 uM), 0,25 µl de *Taq* DNA-polimerase<sup>¶</sup>, 8,25 µl de Água Milli-Q<sup>¶</sup> esterilizada e 10 µl de DNA. Os pares de iniciadores específicos utilizados foram sintetizados segundo Ashimoto et al<sup>1</sup> (1996).

A reação de amplificação foi realizada em termoci-

<sup>§</sup> Hu-Friedy, USA

<sup>¶</sup> Dentsply®, Brasil

<sup>¶</sup> Millipore Ltda., Brasil

<sup>¶</sup> Invitrogen Ltda., Brasil

<sup>¶</sup> Perkin Elmer, Gene Ampl PCR System 9700

clador<sup>t</sup> programado para um ciclo de 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C ou 60°C (segundo cada par de iniciadores específicos) por 30 segundos, um ciclo a 72°C por 30 segundos e um ciclo a 72°C por cinco minutos, para extensão final do DNA.

Após a eletroforese em gel de agarose a 1%, em fonte de corrente<sup>H</sup> a 70V por duas horas e 30 minutos e a coloração do gel com brometo de etídio a 0,5 µg/ml, os produtos da amplificação foram observados sobre transiluminador ultravioleta. Como controle positivo de peso molecular foi usado 1 kb DNA ladder<sup>e</sup> e, como negativo, Água Milli-Q<sup>y</sup> esterilizada.

## Resultados

Os resultados demonstrados na Tabela 1 mostram que o método PCR não detectou, em nenhum dos SPI, a ocorrência de nenhuma das três espécies-alvo, apesar de quatro desses sítios terem apresentado sangramento à sondagem. No entanto, foi detectada a presença de um ou mais dos patógenos-alvo nas BP dos cinco pacientes e até mesmo nos SG-C de três deles.

Na BP do paciente 1 (com 5 mm e SS) foi constatada a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição da amostra a 10<sup>-4</sup>, de *T. denticola* até 10<sup>-2</sup> e de *T. forsythensis* até 10<sup>-1</sup>. No SG-C apenas *P. gingivalis* foi encontrado até a diluição a 10<sup>-2</sup>.

Na BP do paciente 2 (6 mm e S/SS) o DNA de *P. gingivalis* foi detectado até a diluição a 10<sup>-3</sup> e o de *T. forsythensis* até 10<sup>-2</sup>, mas o de *T. denticola* não foi encontrado. No sítio-controle *P. gingivalis* e *T. forsythensis* foram encontradas nas amostras não diluídas.

Na BP do paciente 3 (7 mm e com SS) constatou-se a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição a 10<sup>-3</sup> e de *T. forsythensis* até 10<sup>-1</sup>; *T. denticola* foi encontrado apenas na amostra não diluída. No SG-C apenas *P. gingivalis* foi encontrado na amostra não diluída.

Na BP do paciente 4 (6 mm e SS), *P. gingivalis* ocorreu até a diluição a 10<sup>-2</sup>, *T. denticola* até 10<sup>-1</sup> e *T. forsythensis* não foi encontrado. Nenhuma das três espécies-alvo foi encontrada no SG-C.

Na BP do paciente 5 (6 mm e S/SS) determinou-se a ocorrência de *P. gingivalis* até a diluição a 10<sup>-4</sup>, de *T. denticola* até 10<sup>-1</sup> e de *T. forsythensis* até 10<sup>-2</sup>. No SG-C não foi encontrada nenhuma das três espécies estudadas.

## Discussão

Segundo a teoria da translocação, bactérias instaladas em bolsas periodontais podem colonizar sulcos periimplantares da mesma boca<sup>9,19,20,23,28</sup>.

Com o intuito de avaliar a importância do controle da microbiota patogênica na redução do risco de desenvolvimento de periimplantite<sup>12</sup>, neste trabalho foi analisada, em sulcos gengivais, bolsas periodontais e sulcos periimplantares na mesma boca, a ocorrência semiquantitativa de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis*, patógenos que constituem o complexo vermelho do biofilme subgengival<sup>27</sup>.

A escolha dessas espécies foi baseada em estudos que fortemente as relacionam com o aumento de profundidade da bolsa periodontal e periimplantar e com o sangramento à sondagem, parâmetros classicamente utilizados para determinar a severidade da periodontite e da periimplantite<sup>13-15,26,27</sup>.

A escolha pelo método PCR deu-se em função de sua elevada especificidade (baixo índice de reações cruzadas) e alta sensibilidade<sup>1,2,14,30</sup>. A essas vantagens soma-se a rapidez de execução, visto que o desenvolvimento de *P. gingivalis* e *T. forsythensis* em cultivos é lento e requer meios especiais e técnica de anaerobiose estrita. Em relação às espécies-alvo deste trabalho, a maior vantagem do método PCR é permitir melhor identificação *T. denticola*, muito sensível a pequenos teores de oxigênio e dificilmente cultivável<sup>17,25</sup>.

Os resultados obtidos nos sítios-controle evidenciaram a presença de *P. gingivalis* em três deles, sendo um em associação com *T. forsythensis*. Na verdade, patógenos fazem parte da microbiota suplementar (proporção relativa <1%) do sulco gengival de considerável parte dos indivíduos e suas detecções apenas qualitativas não indicam atividade de doença<sup>26</sup>. Para que a doença se instale é necessário que existam alterações ecológicas que permitam o aumento da frequência de patógenos, incluindo mudanças consistentes no hábitat, como o aumento do fluxo do exsudato sulcular e da condição de anaerobiose, fatores responsáveis, dentre outros, pela ruptura da relação normal de comensalismo inicialmente existente entre a microbiota e o hospedeiro<sup>4,6,11,16,18,29</sup>. Também devem ser consideradas alterações genéticas (polimorfismos) que predisõem ao aparecimento e à gravidade da doença<sup>10</sup>.

Nas bolsas periodontais dos cinco pacientes estudados foi constatada a ocorrência dos DNAs dos patógenos-alvo. Em três delas, sendo que duas apresentavam sangramento à sondagem, os três foram encontrados; em uma, sem sangramento à sondagem, foram detectados os DNAs de *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, e na outra, com sangramento à sondagem, os de *P. gingivalis* e *T. denticola*. *P. gingivalis* foi a espécie-alvo mais prevalente, pois foi a única que teve seu DNA detectado nas maiores diluições (10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>) dos espécimes estudados. Esses resultados confirmam que os microorganismos do complexo vermelho estão fortemente relacionados com a severidade da periodontite.

<sup>H</sup> BioRad®, Brasil

TABELA 1 - RESULTADOS DAS DETECÇÕES PELA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR), DOS DNAs DE P. GINGIVALIS, T. DENTICOLA E T. FORSYTHENSIS CONTIDOS NOS MATERIAIS ANALISADOS NÃO DILUÍDOS E EM DIFERENTES DILUIÇÕES

Paciente	Sítio	MO	ND Diluições											
			10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	
1	SG-C	Pg	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BP 5 mm e SS	Pg	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		Td	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tf	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SPI 2 mm e SS	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	SG-C	Pg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BP 6 mm e S/SS	Pg	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SPI 3 mm e SS	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	SG-C	Pg	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BP 7 mm e SS	Pg	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SPI 5 mm e SS	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	SG-C	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	BP 6mm e SS	Pg	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
		Td	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	SPI 3mm e SS	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	SG-C	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	BP 6mm e S/SS	Pg	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-		
		Td	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
	SPI 5mm e S/SS	Pg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Td	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Tf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

SG-C: sulco gengival-controle  
 SPI: sulco periimplantar  
 S/SS: sem sangramento à sondagem  
 MO: microorganismo  
 Td: Treponema denticola

BP: bolsa periodontal  
 SS: sangramento à sondagem  
 ND: amostra não diluída  
 Pg: Porphyromonas gingivalis  
 Tf: Tannerella forsythensis

## Conclusão

A ausência de detecção dos microorganismos do complexo vermelho nos cinco sulcos periimplantares analisados, embora quatro apresentassem sangramento à sondagem, pode estar relacionada à ausência de indícios de periimplantite. Outro fato a ser considerado é que o resultado negativo nem sempre expressa a ausência de microorganismos, devido à possibilidade de erros técnicos na coleta, transporte e processamento laboratorial<sup>7</sup>, sendo algumas vezes necessária a repetição do exame. Por outro lado, o fato de trabalharmos com amostras de materiais implica em certa aleatoriedade na coleta de microorganismos.

Os resultados confirmam o consenso da literatura, segundo o qual o controle da microbiota desenvolvida ao redor dos pilares intermediários instalados sobre a superfície dos implantes bucais é imperativo para obter longevidade, fundamentada na saúde dos tecidos periimplantares.

Apesar de não terem sido detectados em sítios periimplantares sem sinais de perimplantite, os patógenos *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis* tiveram seus DNAs identificados no sulco gengival e, principalmente, na bolsa periodontal dos mesmos pacientes. Essa ocorrência não pode ser encarada como anormal, mas pode ser um sinal de alerta de risco de doença, tornando indispensável um controle mais efetivo do biofilme periodontal.

### Endereço para correspondência:

Nilson Roberto Armentano  
Rua Marcelina, 590 - Vila Romana  
05044-010 - São Paulo - SP  
Tel.: (11) 3865-4843  
nilson.armentano@terra.com.br

### Referências

- Ashimoto A, Chen C, Bakker J, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:266-73.
- Avila-Campos MJ, Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2002;44:1-5.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:31-8.
- De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ. Relações Microbiota-Hospedeiro: Infecção e Resistência. In: De Lorenzo JL. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. Cap.2. p. 11-32.
- De Lorenzo JL, Mayer MPA. *Microbiologia das Doenças Periodontais*. In: De Lorenzo JL. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. Cap. 9. p. 127-50.
- De Lorenzo JL, Simionato MRL, De Lorenzo A. Infecção: principal causa de insucessos em implantes dentários. *Rev ABO Nac* 1997;5:321-4.
- Estrela C, Pimenta FC, Estrela CRA. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa odontológica. In: Estrela C. *Metodologia Científica, Ensino e Pesquisa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. Cap. 11. p. 196-221.
- Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 1993;4:53-64.
- Gouvoussis J, Sindhusake D, Yeung S. Cross-infection from periodontitis sites to failing implant sites in the same mouth. *Int J Maxillofac Implants* 1997;12:666-73.
- Heydenrijk K, Meijer HJA, van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissing A, Stegenga B. Microbiota around root-endosseous implants: A review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:829-38.
- Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson L-Å, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological finding and host response in patients with periimplantitis. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:349-58.
- Kalykakis G, Gregory-George KZ, Yildirim M, Spiekermann H, Russell JN. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J Periodontol* 1994;65:766-70.
- Kasuga Y, Ishihara K, Okuda K. Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bull Tokyo Dent Coll* 2000;41:109-17.
- Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction in Subjects with Different Periodontal Status. *J Periodontol* 2003;74:798-802.
- Lee KH, Maiden MFJ, Tanner ACR, Weber HP. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol* 1999;70:131-8.
- Leonhardt Å, Adolfsson B, Lekholm U, Wikström M, Dahlén G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 1993;4:113-20.
- Mayer MPA, De Lorenzo JL. *Métodos de Estudo em Microbiologia Oral*. In: De Lorenzo JL. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. p.43-54.
- Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1995;22:124-30.
- Papaioannou W, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 1996;7:405-9.
- Quirynen M, Teughels W. Microbiologically compromised patients and impact on oral implants. *Periodontol* 2000 2003;33:119-28.
- Quirynen M, Listgarten MA. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. *Clin Oral Implants Res* 1990;1:8-12.
- Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent* 1984;51:529-34.
- Richard PE. Microbial colonization of the peri-implant environment and its relevance to long-term success of osseointegrated implants. *Int J Prosthodont* 1998;11:433-41.
- Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res* 1991;2:135-44.
- Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995;20 Suppl 2:S304-7.
- Socransky S, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002;28:12-55.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RLJ. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.
- Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:696-702.
- van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002;29:1023-8.
- Watanabe K, Frommel TO. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res* 1993;6:1040-4.