

## MICROBIOTA ASSOCIADA AO INSUCESSO DE IMPLANTES DE TITÂNIO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS

Microbiota associated to failing titanium implants in non-human primates

Elerson Gaetti Jardim Júnior\*  
Ana Claudia Okamoto\*\*  
Samira Âmar Lins\*\*\*  
Sérgio Ricardo de Oliveira\*\*\*\*  
Roberto Sales e Pessoa\*\*\*\*  
Luis Fernando Landucci\*\*\*\*\*

### RESUMO

A microbiota, associada às peri-implantites em 3 macacos da espécie *Cebus apella*, foi avaliada por meio de cultura e por reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se o exame intrabucal, periodontal e peri-implantar nos primatas. Os implantes tinham 3,75 mm de diâmetro e 8,5 mm de comprimento e eram de dois tipos, do Brånemark System (NobelBiocare, Gotemburgo, Suécia): MKIII Usinado (uma peça) e MKIII Ti Unite Oxidado (duas peças). Os implantes apresentavam mobilidade e supuração por meio de bolsa peri-implantar e foram cirurgicamente removidos e transferidos para meio de transporte VMGA III (Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared and sterilized, III). Também foram coletadas amostras de 3 sítios periodontais próximos aos implantes. Os espécimes clínicos foram inoculados em meios de cultura seletivos e não seletivos e incubados em anaerobiose e aerobiose, por até 21 dias, a 37° C. A identificação dos isolados foi realizada por meio de provas bioquímico-fisiológicas. O DNA das amostras também foi submetido à amplificação por PCR, empregando-se iniciadores específicos para microrganismos bucais. Nas reações, foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Verificou-se participação elevada de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* e a presença de várias espécies de bactérias entéricas no periodonto e sítios peri-implantares dos primatas. *A. actinomycetemcomitans*, *D. pneumosintes*, *M. micros*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* não foram detectados através de cultura e pelo PCR.

### UNITERMOS

### INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A instalação de implantes e próteses por eles suportadas, quando adequadamente indicada e realizada, está associada a taxas elevadas de sucesso, permitindo uma reabilitação duradoura das funções do aparelho estomatognático (Alsaadi *et al*<sup>3</sup> 2007). Entretanto, diversos fatores locais ou sistêmicos, como o fumo, osteoporose, doença de Crohn, características do próprio implante (comprimento, diâmetro e posicionamento) e condição dos dentes adjacentes (Alsaadi *et al*<sup>3</sup> 2007), podem modificar a resposta clínica ao implante, levando ao fracasso do tratamento.

As semelhanças físicas, bioquímicas e genéticas entre os primatas sempre fizeram com que os mesmos fossem muito utilizados na pesquisa biológica como modelos de diferentes tipos de doenças que afetam os humanos (Casatti *et al*<sup>6</sup> 2002; Lowenstine<sup>16</sup> 2003), particularmente em odontologia (Nagata *et al*<sup>17</sup> 2003; Cancian *et al*<sup>8</sup> 2004). Dentre os primatas do continente americano, destaca-se *Cebus apella* pela sua ampla distribuição geográfica de ocorrência e vigorosa população, bem como adaptação a condições de reprodução assistida, o que o torna um bom modelo de estudo.

Como em outras áreas da saúde, o desenvolvimento de novos materiais, ligas metálicas para implante, modalidades de tratamento para patologias peri-implantares e desenhos estruturais dependem da realização de ensaios experimentais em modelos

animais, destaca-se o emprego de primatas não-humanos. Contudo, como parte significativa das patologias que levam ao fracasso dos implantes osseointegrados é de natureza infecciosa (Botero *et al*<sup>6</sup> 2005; Renvert *et al*<sup>20</sup> 2007), é alarmante o fato de que desconhecemos a microbiota periodontal e perimplantar desses primatas, dificultando a comparação com dados obtidos de pacientes e o próprio emprego desses primatas como modelos de estudo em implantodontia.

As dificuldades de acesso que pesquisadores encontram no emprego de primatas do “Velho Mundo”, bem como o custo elevado desses animais, vêm limitando seu uso como modelo de estudo em Odontologia. Por outro lado, os primatas do “Novo Mundo”, no nosso país, estão sob elevada pressão ambiental, sendo que muitos correm o risco de se extinguir nas próximas décadas, tornando seu uso como modelos de estudo na Odontologia impraticável. Contudo, em anos recentes, sob supervisão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a FOA – UNESP, criou o Núcleo de Procriação do Macaco Prego, com o intuito de manter uma população saudável desses primatas em liberdade, enquanto, através de reprodução assistida, animais são disponibilizados para estudos, onde se destacam as interações com pesquisadores de 11 países.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de cultura e PCR, a microbiota associada ao insucesso de 3 implantes de titânio inseridos no rebordo

\* Professor Adjunto disciplina de Microbiologia e Imunologia FOA-UNESP

\*\* Professora Doutora disciplina de Microbiologia e Imunologia FOA-UNESP

\*\*\* Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Estomatologia FOA-UNESP

\*\*\*\* Doutorando do Programa de Pós-graduação em Periodontia FOA-UNESP

\*\*\*\*\* Professor Doutor da disciplina de Microbiologia e Imunologia FOSJRP-UNIRP;  
Professor Doutor da disciplina de Patologia Geral e Bucal FISA-FUNEC.



alveolar de primatas não-humanos da espécie *Cebus apella*.

## MATERIALE MÉTODOS

### Seleção de primatas *Cebus apella* (macacos-prego)

Os espécimes clínicos foram obtidos de 3 primatas não humanos do sexo masculino, com peso variando de 2,5 kg a 3,5 kg, com idade de 6-8 anos. Eles foram mantidos em cativeiro no Núcleo de Procriação do Macaco Prego (UNESP-Araçatuba), os quais vinham sendo alimentados com cereais, frutas e água *ad libitum*, em ambiente de umidade e temperatura controladas e com avaliação periódica das condições sistêmicas de saúde. Nenhum dos animais apresentava história de desordem sistêmica. Cada primata havia recebido um único implante.

Todos os procedimentos relativos ao exame clínico intrabucal, periodontal e periimplantar dos animais, bem como a coleta dos espécimes para análise microbiológica, foram realizados após a anestesia dos primatas com cloridrato de cetamina (15mg/Kg), por via intramuscular.

### Avaliação clínica e coleta dos espécimes para análise

Os implantes tinham 3,75 mm de diâmetro e 8,5 mm de comprimento e eram de dois tipos pertencentes ao Brånemark System (Nobel Biocare, Gotemburgo, Suécia): MKIII Usinado (uma peça) e MKIII Ti Unite Oxidado (duas peças). Os implantes, posicionados na região de pré-molares superiores, apresentavam mobilidade e supuração por meio de bolsa peri-implantar e foram cirurgicamente removidos e transferidos para meio de transporte VMGA III, para reduzir o contato com o oxigênio molecular.

Também foram coletadas amostras de 3 sítios periodontais nos dentes próximos aos implantes como parâmetro com as condições microbiológicas periodontais. Esses sítios periodontais apresentavam perda óssea e inflamação gengival compatíveis com periodontite.

### Isolamento bacteriano e identificação dos isolados

No laboratório, os espécimes clínicos dos 3 casos de peri-implantite foram submetidos a diluições seriadas em VMGI (Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared and sterilized, I) e

alíquotas de diluições pré-estabelecidas foram inoculadas em: ágar Fastidious Anaerobe enriquecido com extrato de levedura (0,5%), hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de cavalo, incubado em anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>), a 37° C, por 14 e 21 dias, para isolamento dos anaeróbios; ágar de tripticaseína de soja, acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo, incubado em aerobiose, a 37° C, por 2 e 3 dias, para isolamento de aeróbios e anaeróbios facultativos; ágar McConkey, incubado em aerobiose, a 37° C, por 2 dias, para isolamento de microrganismos entéricos anaeróbios facultativos.

A proporção de cada espécie ou gênero microbiano, na população total, foi calculada como a fração representada pelo crescimento da espécie nos meios seletivos em relação ao crescimento microbiano nos meios de cultura não seletivos e enriquecidos. Após o isolamento dos microrganismos e obtenção de cultura pura, realizaram-se as análises morfofocelar e morfocolonial dos mesmos, além do teste respiratório, para caracterizar o relacionamento dos diferentes microrganismos com o oxigênio atmosférico e prova da catalase. A seguir, procedeu-se à identificação, em nível de gênero, e, quando possível, nível de espécie dos isolados, por meio de provas bioquímico-fisiológicas (Gomes *et al*<sup>11</sup> 2004). Também foram realizados testes de resistência a sais biliares, hidrólise da esculina, hemaglutinação, produção de gás, indol e sulfeto de hidrogênio.

### Detecção dos principais patógenos

**Tabela 1.** Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<b>A. actinomycetemcomitans</b>	5'-CTAGGTATCTGCGAAACACAGTTTG -3' 5'-CCTAGAAGGATTAAGTCTGGTAATC -3'	60°C
<b>D. pneumosintes</b>	5'-TTCTAAGACATCGACATTGGTGC -3' 5'-GACTTTCGCTTCTCATTGTTTG -3'	57°C
<b>F. nucleatum</b>	5'-ATTATCGTGGCTAAATATAGTT -3' 5'-ACCCTCACCCATTGAGGATTAATC -3'	40°C
<b>M. micros</b>	5'-GGTCAAACGATTTATCGGTGTA -3' 5'-CCTCTCAGACCGAACGCAACTG -3'	58°C
<b>P. gingivalis</b>	5'-TGTGATGACTGAATRTATGGTGAACC -3' 5'-ACGTCATAACTGCCACCTTCTCCTC -3'	60°C
<b>P. intermedia</b>	5'-TTTGTGTAATCGGGAGTAAAGCGGG -3' 5'-TTCAACATCGGTCTCTGTATCCTGCGT -3'	55°C
<b>P. nigrescens</b>	5'-ATGAAACAAATCGAGGTTTCCGGTAAG -3' 5'-CCACGCTCTATCGTTGTGGCTGCGA -3'	55°C
<b>T. denticola</b>	5'-TAATACTGCCTAATGTGCTCATTACAT -3' 5'-CAAGAAGCATCCCTCCGATTTCTCTA -3'	55°C
<b>T. forsythia</b>	5'-GCATGTAACGTAGGTTGCCGCA -3' 5'-TGCTTCAAATCGGTTGTCAGTTATACCT -3'	60°C

### anaeróbios obrigatórios e facultativos por PCR

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com VMGA III foi extraído por meio do "kit" QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. Por PCR, avaliou-se a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Dialister pneumosintes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia* (Ávila-Campos & Velasquez-Meléndez<sup>5</sup> 2002; Tamura *et al*<sup>21</sup> 2006). Na Tabela 1, são apresentados os respectivos iniciadores específicos utilizados.

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 µl mM), 1,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de Taq DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 1 µl de DNA. A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (30s-1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que varia de 30s. a 2 min., 72°C (1 min.-2 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação.

Em todas as reações, foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre

transiluminador de luz UV. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP).

## RESULTADOS

Por meio de cultura, foram detectadas elevadas proporções de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* e a presença de microrganismos que, comumente, não fazem parte da microbiota bucal de humanos, como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, e *Serratia* sp. (Tabela 2).

A microbiota associada à peri-implantite variou consideravelmente para cada macaco, mas a presença de enterobactérias e outros microrganismos entéricos foi uma constante nos achados. A maioria dos microrganismos isolados dos sítios peri-implantares também foi detectada no periodonto adjacente, particularmente para os anaeróbios testados. O fator gênero do animal não influenciou o isolamento e a detecção dos microrganismos estudados. *A. actinomycetemcomitans*, *D. pneumosintes*, *M. micros*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* não foram detectados por meio de cultura e pelo PCR.

## DISCUSSÃO

Uma vez que a microbiota bucal e peri-implantar de *C. apella* não foi caracterizada, optou-se por avaliar a contaminação peri-implantar dos primatas por meio de cultura em meios seletivos e não seletivos, bem como por meio de método molecular, como advogado por Leonhardt et al<sup>15</sup> (2003).

A microbiota bucal de primatas não

humanos do “Novo Mundo” ainda constitui área não explorada da Microbiologia Bucal e Veterinária. Dessa forma, é difícil extrapolar resultados obtidos para humanos em relação à etiologia das diferentes patologias infecciosas que acometem a cavidade bucal, criando limitações para a utilização desses primatas como modelos de estudos em Implantodontia, visto que o desempenho clínico do implante instalado está intimamente dependente do comportamento do biofilme bucal (Covani et al<sup>10</sup> 2006; Barbour et al<sup>4</sup> 2007; Renvert et al<sup>20</sup> 2007).

Em humanos, grande importância vem sendo dada à participação de periodontopatógenos clássicos na etiologia da peri-implantite e da mucosite peri-implantar (Hultin et al<sup>13</sup> 2002; Botero et al<sup>6</sup> 2005; Leitão et al<sup>14</sup> 2005; Pfau & Avila-Campos<sup>18</sup> 2005), entretanto a heterogeneidade de literatura é tamanha que não se pode estabelecer uma microbiota de relevância para essas condições clínicas.

Os resultados apresentados na Tabela 2 evidenciam que parcela não desprezível da microbiota isolada/detectada é composta por microrganismos cujo principal habitat, em humanos, seria a mucosa intestinal, mas possivelmente em função da coprofagia (minimizada pela utilização de gaiolas especiais que permite a passagem das fezes e a limpeza diária do ambiente de criação dos primatas) freqüente em *Cebus apella*. Contudo, os resultados do presente estudo se aproximam dos observados por Alcoforado et al<sup>2</sup> (1991), que verificaram que, além dos microrganismos anaeróbios obrigatórios e *A. actinomycetemcomitans*, normalmente associados às infecções peri-implantares, também foram encontrados microrganismos entéricos,

fungos e estafilococos.

É provável que os dados da Tabela 2 subestimem a real participação de microrganismos entéricos na peri-implantite em primatas, visto que a mesma foi avaliada apenas pelos métodos convencionais de cultura e não por PCR, mas isso se deve à ausência prévia de conhecimentos sobre a microbiota dessa espécie de primatas. Estudos futuros deverão levar esse aspecto em consideração.

De forma geral, esses microrganismos entéricos dão origem a infecções graves e podem levar a infecções persistentes, as quais são causas comuns em implantes que sofreram falhas no processo de osteointegração (Groenendijk et al<sup>12</sup> 2004). Como observado por Barbour et al<sup>4</sup> (2007), a colonização precoce de superfícies expostas do implante pode acelerar o desenvolvimento de peri-implantite, sendo que se pode conjecturar se a participação desses microrganismos entéricos, normalmente são capazes de dar origem a reações inflamatórias intensas e infecções persistentes.

Em humanos, a ocorrência de bactérias entéricas é favorecida pela eliminação de parte da microbiota endógena da cavidade bucal, mas os primatas estudados não haviam recebido antimicrobianos com amplo espectro de ação, o que dificulta conjecturas sobre o papel da microbiota bucal anaeróbia no estabelecimento de espécies entéricas, reforçando a hipótese da participação da coprofagia como fonte dessa contaminação exógena. Contudo, para os anaeróbios obrigatórios, a fonte de contaminação dos sítios peri-implantares parecer ser o próprio periodonto adjacente, como também observado para humanos (Callan et al<sup>7</sup> 2005; Agerbaek et al<sup>1</sup> 2006; Quirynen et al<sup>19</sup> 2006; Renvert et al<sup>20</sup> 2007). Essa informação reforça a idéia de que a realização de procedimentos experimentais envolvendo implantes de titânio nesses primatas exige a realização da avaliação bucal prévia bastante detalhada, visto que 50 primatas examinados pelo nosso grupo, 17 apresentavam periodontite, como também ocorreu com os 3 animais que desenvolveram peri-implantite, 20 possuíam gengivite e 13 eram, de fato, sadios (dados não publicados).

## CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que a peri-implantite em *Cebus apella* é

**Tabela 2.** Prevalência de microrganismos entéricos em pacientes com diferentes condições periodontais.

Microrganismos	Presença (+) ou ausência (-) do microrganismos na Bolsa peri-implantar / Bolsa periodontal		
	Macaco I	Macaco II	Macaco III
<b>Microrganismos entéricos</b>			
<i>Citrobacter freundii</i>	-/-	-/-	+/-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-/-	-/-	+/-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	+/-	+/-	-/-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+/-	+/+	-/-
<i>Proteus vulgaris</i>	-/+	-/+	+/+
<i>Proteus mirabilis</i>	+/-	-/-	+/-
<i>Serratia</i> sp.	-/-	-/+	+/+
<b>Microrganismos bucais</b>			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+/+	+/+	+/+
<i>Prevotella intermedia</i>	-/-	-/-	+/+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+/+	+/+	-/-
<i>Treponema denticola</i>	+/+	-/-	-/-



substancialmente diferente daquela observada em humanos e esses aspectos devem ser considerados quando da elaboração de protocolos experimentais envolvendo essa espécie.

## SUMMARY

The microbiota associated with the periimplantitis in 3 *Cebus apella* monkeys was evaluated by culture and PCR. The intra-buccal, periodontal, and periimplant examination were done in the primates. The implants had 3.75 mm of diameter and 8.5 mm of length and were of two Brånemark System (NobelBiocare, Gotemburgo, Suécia) different types: MKIII Smooth (one piece) and MKIII Ti Unite Oxidated (two pieces). The implants showed mobility and suppuration by the periimplant pocket and were surgically removed and transferred for the VMGA III environment. Samples of 3 periodontal sites, near to the implants, were also collected. The specimens were inoculated in culture selective and non-selective environment and incubated in anaerobiose and aerobiose for 21 days interval in 37 °C. The identification of the isolated was done by biochemical-physiological tests. The samples' DNA were also submitted to amplification by PCR using specific indicators for buccal microorganisms. In the reactions, the DNA of reference specimens of the studied microorganisms was used as positive control. *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* were found, as well as many other bacteria in both the periodontal and periimplant sites of the primates. *A. actinomycetemcomitans*, *D. pneumosintes*, *M. micros*, *P. nigrescens* and *T. forsythia* were not detected by both the culture and PCR.

## UNITERMS

Periimplantites, Infection, Bacteria, Primates, *Cebus apella*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agerbaek MR, Lang NP, Persson GR. Comparisons of bacterial patterns present at implant and tooth sites in subjects on supportive periodontal therapy. I. Impact of clinical variables, gender and smoking. Clin Oral Impl Res 2006;17:18-24
2. Alcoforado GAP, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. J Periodontol 1991;10:11-8.
3. Alsaadi G, Quirynen M, Komarek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. J Clin Periodontol 2007;34:610-7.
4. Barbour ME, O'Sullivan DJ, Jenkinson HF, Jagger DC. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. J Mater Sci Mater Med 2007;18:1439-47.
5. Avila-Campos MJ, Velasquez-Melendez 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.
6. Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. J Periodontol 2005;76:1490-95.
7. Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA Probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: A preliminary study. J Periodontol 2005;76:115-20.
8. Cancian DCJ et al. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. Int J Oral Maxillofac Implants 2004;19:73-9.
9. Casatti CA et al. Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. Neuroscience 2002;115:899-915.
10. Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. Implant Dent 2006;15:298-304.

11. Gomes BPFA et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 2004;19:71-6.
12. Groenendijk E, Dominicus JJK, Moorer WR, Aartman IHA, van Waas MAJ. Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 31-Titameds implants. Clin Oral Impl Res 2004;15:174-9.
13. Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom H, Johansson LA, Ekfeldt A & Klinge B. (2002) Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. Clinical Oral Implants Research 13:349-58.
14. Leitão JAO, 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;19(1):52-7.
15. Leonhardt A, Bergstrom C, Lekholm U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. Clin Implant Dent Rel Res 2003;5:226-32.
16. Lowenstine LJ. A primer of primate pathology: lesions and non-lesions. Toxicol Pathol 2003;31(1):92-102.
17. Nagata MJH et al. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline. A histologic study in monkeys. J Periodontol 2003;73:1400-4.
18. Pfau EA, Avila-Campos MJ. Prevotella intermedia and Porphyromonas gingivalis isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial. Susceptibility. Braz J Microbiol 2005;36:281-5
19. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. Clin Oral Impl Res 2006;17:25-37.
20. Renvert S, Roos-Jansäker A-M, Lindahl C, Renvert H, Persson GR. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. Clin Oral Impl Res 2007;18:509-16.
21. Tamura K et al. Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. Arch Oral Biol 2006;51:371-7.

## AUTOR RESPONSÁVEL

**Roberto Sales e Pessoa**

Tel: (34) 32122926 / (34) 91216569

E-mail: rspessoa@uol.com.br

Recebido para publicação: 20/10/2007

Aceito para publicação: 15/11/2007