



DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ENNYO SOBRAL CRISPIM DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DO BIOFILME
SUBGENIVAL PERI-IMPLANTAR PELA TÉCNICA SANGER**

Guarulhos

2013

ENNYO SOBRAL CRISPIM DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DO BIOFILME
SUBGENGIVAL PERI-IMPLANTAR PELA TÉCNICA SANGER**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos para
a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Periodontia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri
Co-orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Guarulhos

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Fernando Gay da Fonseca.

S586a

Silva, Ennyo Sobral Crispim.

Avaliação da diversidade da bacteriana do biofilme subgengival do peri-implante pela técnica Sanger / Ennyo Sobral Crispim Silva, 2013.

58 f.: il.; 31 cm

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós – Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri.

Bibliografia: f. 39-43

1. Periimplantite. 2. Microbiota subgengival. 3. Bactérias não-cultiváveis.

4. Gene 16S rRNA. 5. Sondas genômicas. I. Título. II. Universidade

Guarulhos.

CDD - 617



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada “AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DO BIOFILME PERI-IMPLANTAR PELA TÉCNICA SANGER” em sessão pública realizada em 31 de Janeiro de 2013 considerou o candidato Ennyo Sobral Crispim da Silva aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG)

2. Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro (USP)

3. Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin (UNIP)

4. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG)

5. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG)

Guarulhos, 31 de Janeiro de 2013.

Dedico este trabalho à minha
família, amigos e todos os que
contribuíram para que ele
fosse possível e real

AGRADECIMENTOS

À Deus, inteligência suprema e causa primeira de todas as coisas e sem Ele nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo de Faveri, pela dedicação, atenção e disponibilidade. Um exemplo de professor e pessoa, com quem aprendi muito e sem a sua orientação e ajuda nada disso seria possível. Meu muito obrigado!

Aos meus pais, Severino Celestino da Silva e Maria das Graças Sobral Crispim da Silva, e minha irmã, Sheylla Helena Sobral Crispim da Silva, exemplos para mim e meu apoio e refúgio de todas as horas.

À minha esposa, Paula Isabel Nóbrega Introine Silva, que esteve ao meu lado, apoiando e me dando forças e que soube como ninguém entender minhas ausências.

Ao meu irmão e cunhada, Dennys Sobral Crispim da Silva e Dayana Kelly Silva Oliveira pelo apoio incondicional e acolhida em todas as minhas vindas à São Paulo.

Ao meu querido e eterno amigo, Roberto Lyra de Brito (*in memoriam*), que me apoiou e incentivou durante toda minha vida profissional e acadêmica, que me incentivou a seguir em frente no aperfeiçoamento profissional, mas que infelizmente não está materialmente conosco em mais esta conquista.

Aos professores que estiveram conosco no Doutorado, passando o conhecimento que nos foi essencial para que chegássemos até aqui.

Aos meus colegas de Doutorado, Luiz Carlos Braga, Eduardo Lobão, Diêgo de Carvalho Souza e Maurilo Lemos pela amizade e cumplicidade durante todo o curso.

Às colegas de Doutorado, Joyce Pinho Bezerra, Josefa Mestnik, Geisla Soares e Vanessa Santos com as quais convivi e aprendi bastante durante o curso.

Às minhas amigas Tânia Ribas e Fernanda Sampaio Ramiro pela convivência, auxílio e aprendizado.

À querida Izilvânia, que tantas dúvidas elucidou nos momentos em que trabalhamos e convivemos no Laboratório de Pesquisa.

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

“Na ignorância não conseguiríamos como não conseguiremos, enxergar o caminho que Deus traçou a cada um de nós na

Terra. Todos nós, sejamos crianças ou jovens, adultos ou já muitíssimo maduros, devemos estudar sempre.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi examinar através do sequenciamento de Sanger a diversidade bacteriana associada com a saúde e doença peri-implantar, e identificar diferenças entre as comunidades bacterianas em cada uma dessas condições clínicas. Vinte indivíduos foram divididos em 2 grupos: um Controle (n=10), consistindo de indivíduos com implantes saudáveis; e um Teste (n=10), no qual participaram os indivíduos com sítios acometidos por peri-implantite e pelo menos um implante saudável. No grupo Teste, amostras do biofilme subgengival foram coletadas dos sítios mais profundos dos implantes doentes. Para ambos os grupos, foram coletadas amostras do biofilme subgengival de um sítio com saúde peri-implantar. O DNA foi extraído das amostras e o gene *16S rRNA* foi amplificado por um par de primers universais para o domínio Bacteria, sequenciado e as espécies foram identificadas por comparação com sequências *16S rRNA* conhecidas. As diferenças entre os dois grupos para idade, parâmetros clínicos e proporção do biofilme nas amostras foram avaliadas através do Teste-*t* de Student (para a proporção do biofilme dentro do grupo Teste utilizou-se o Teste-*t* de Student pareado). O teste Qui-quadrado foi aplicado para a variável gênero. O nível de significância adotado foi de 5%. A identidade filogenética de 1.387 clones do gene *16S rRNA* foi determinada. Os implantes saudáveis apresentaram altas proporções de *Actinomyces*, *Atopobium*, *Kingella* e *Rothia* e baixos níveis de *Desulfobulbus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Filifactor*, *Mitsukella*, *Porphyromonas*, *Parvimonas* e *Pseudoramibacter* ($p<0,05$) quando comparados aos implantes com peri-implantite. Nos sítios com peri-implantite, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister invisus*, *Streptococcus HOT 064*, *Filifactor alocis* e *Mitsuokella* sp. HOT 131 apresentaram altas proporções, enquanto *Veillonella dispar*, *Actinomyces meyeri*, *Granulicatella adiacens* mostraram baixas proporções quando comparados com os implantes saudáveis dos grupos Controle e Teste ($p<0,05$). Foram observadas diferenças na composição do biofilme subgengival entre implantes saudáveis e doentes. A microbiota associada com a peri-implantite se mostrou composta por espécies bacterianas patogênicas do complexo laranja bem como por espécies não comumente associadas à doença tais quais *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* e *Mitsuokella* sp. HOT 131.

Palavras-chaves: Periimplantite, microbiota subgengival, bactérias não-cultiváveis, gene *16S rRNA*, sondas genômicas.

ABSTRACT

To examine the microbial diversity associated with peri-implant health and disease, and to identify differences between the bacterial communities in these clinical conditions by using Sanger sequencing. Twenty subjects were assigned into a Control group consisting of subjects with healthy implants; and a Test group, consisting of subjects with peri-implantitis sites, as well as a healthy implant (n=10/group). In the Test group, subgingival biofilm samples were taken from the deepest sites of the diseased implant. In both groups, samples were collected from one site around a healthy implant. DNA was extracted and the 16S rRNA gene was amplified with universal primer pairs for Bacteria, sequenced, and the phylotypes were identified by comparison with known 16S rRNA sequences. The significance of differences between the two groups for age, clinical parameters and proportion of species in subgingival biofilm was sought using Student's *t*-Test (significance of differences within samples in the Test group was assessed using paired Student's *t*-Test). Chi-square test was employed to compare the differences in the frequency of gender. The level of significance was set at 5%. The phylogenetic identity of 1,387 16S rRNA gene clones was determined. Healthy implants demonstrated higher proportions of *Actinomyces*, *Atopobium*, *Kingella* and *Rothia* and lower levels of *Desulfobulbus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Filifactor*, *Mitsukella*, *Porphyromonas*, *Parvimonas* and *Pseudoramibacter* ($p<0.05$). *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister invisus*, *Streptococcus* HOT 064, *Filifactor alocis* and *Mitsuokella* sp. HOT 131 presented a higher mean proportion, while *Veillonella dispar*, *Actinomyces meyeri*, *Granulicatella adiacens* showed lower mean proportions in the periimplantitis sites when compared with healthy implants in both the Control and Test groups ($p<0.05$). Striking differences were observed in the composition of subgingival biofilm between healthy and diseased implants. The microbiota associated with periimplantitis was comprised of more pathogenic bacterial species from the orange complex, as well as unusual species such as *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* and *Mitsuokella* sp. HOT 131.

Keywords: Peri-implantitis, subgingival microbiota, non cultivable bacteria, gene 16S rRNA, genomic probes.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 Peri-implantite | 10 |
| 1.2 Microbiologia da Peri-implantite – agente etiológico | 11 |
| 1.2.1 Diversidade bacteriana | 14 |
| 2 OBJETIVO | 19 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Seleção da população | 20 |
| 3.2 Critérios de inclusão e exclusão | 20 |
| 3.2.1 Critérios de inclusão | 20 |
| 3.2.2 Critérios de exclusão | 21 |
| 3.3 Avaliação clínica | 21 |
| 3.4 Seleção dos sítios testes | 22 |
| 3.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival | 22 |
| 3.5 Análise microbiológica | 23 |
| 3.5.1 Extração de DNA | 23 |
| 3.5.2 Amplificação da região 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) | 23 |
| 3.5.3 Clonagem | 24 |
| 3.5.4 Sequenciamento | 25 |
| 3.5.5 Análise dos dados dos 16S rRNAs sequenciados | 26 |
| 3.5.6 Análise Estatística | 26 |
| Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing | 27 |
| 4 CONCLUSÃO | 49 |
| REFERÊNCIAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peri-implantite

A osseointegração foi definida por Bränemark e colaboradores em 1969 como sendo a aposição de tecido ósseo ao redor do implante dental sem a formação de tecido fibroso entre esse tecido e a superfície do implante (Esposito et al., 1999). Embora os índices de sucesso obtidos com este tipo de reabilitação ultrapassem 95% após um período médio de 5 a 10 anos em função, os fracassos e a perda de osseointegração dos implantes ainda acontecem (Mombelli et al., 1987; Becker et al., 1990; Quirynen et al., 1990; Rosenberg et al., 1991; Fiorellini et al., 1998; Listgarten e Lai, 1999; van Winkelhoff et al., 2000; Ferrigno et al., 2002; Albrektsson e Donos, 2012).

A perda de implantes pode ser classificada em perda precoce ou tardia. A falha precoce acontece quando não ocorre a osseointegração e normalmente está associada a diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como o consumo exagerado de cigarros, doenças sistêmicas, qualidade e quantidade óssea do leito receptor (Jaffin e Berman, 1991; Bain e Moy, 1993; Hutton et al., 1995; Chuang et al., 2002; van Steenberghe et al., 2002; Klinge et al., 2005; Quirynen et al., 2007). As falhas precoces podem estar relacionadas à algum problema durante o procedimento cirúrgico, como o trauma cirúrgico, super aquecimento ósseo ou contaminação bacteriana. A estabilidade inicial do implante também pode interferir no sucesso imediato da osseointegração (Esposito, 1998; Quirynen et al., 2002; Shibli et al., 2005; Grassi et al., 2007). A falha tardia ocorre normalmente após a instalação de carga protética gerando uma perda da osseointegração previamente obtida (Esposito et al., 1998; Quirynen et al., 2002). Tal falha, quando associada à contaminação da superfície dos implantes por bactérias patogênicas, é denominada peri-implantite (Sakka e Coulthard, 2011; Shibli et al., 2008). Além disso, as perdas precoces ou tardias podem ter como fator secundário a sobrecarga oclusal (Isidor, 1997; Esposito, 1998; Sakka e Coulthard, 2011).

O termo peri-implantite foi introduzido no final da década de 80 (Mombelli et al., 1987), e definido como um processo infeccioso que produz inflamação dos tecidos ao redor do implante osseointegrado em função, resultando muitas vezes em perda óssea e até mesmo na perda do implante (Albrektsson e Isidor, 1994; Mombelli e Lang, 1998). Os pacientes acometidos pela peri-implantite podem relatar

dor espontânea, bem como dor à mastigação, percussão e palpação (Heydenrijk et al., 2002). Os sinais da inflamação dos tecidos peri-implantares variam desde uma inflamação restrita aos tecidos moles (mucosite) ou então casos mais avançados que apresentem sangramento à sondagem, supuração, perda clínica de inserção e perda óssea em forma de taça observada radiograficamente, o que caracteriza a peri-implantite (Mombelli, 1999; Melo et al., 2007). No 1º Workshop Europeu em Periodontia, ficou acordado que o termo peri-implantite deveria ser usado especificamente para processos inflamatórios em torno dos implantes osseointegrados e em função, que levasssem à formação de bolsa e perda óssea ao redor dos implantes, o que implica que deve haver uma osseointegração sem perturbações anteriores (Albrektsson e Isidor, 1994).

A peri-implantite, segundo o estudo de Zitzmann e Berglundh (2008), mostra-se presente em 56% dos indivíduos e em 43% dos implantes em função há pelo menos cinco anos. Entretanto, esta alta prevalência da peri-implantite é ainda questionada (Klinge e Meyle, 2012). Dados mais recentes, demonstram que a peri-implantite acometeria cerca de 20% dos indivíduos e 10% dos implantes em um período médio de acompanhamento de 5-10 anos (Mombelli et al., 2012). Uma revisão sistemática sobre falha dos implantes após o recebimento da carga aponta uma taxa de falha anual estimada em 0,29 (95% IC: 0,17-0,47; 36 estudos) em 5 anos e 0,35 (95% IC: 0,15-0,83; 10 estudos) em 10 anos (Jung et al., 2012).

De forma semelhante às doenças periodontais (periodontite), as infecções peri-implantares são resultantes da presença em níveis elevados de microrganismos patogênicos presentes no biofilme peri-implantar. Assim sendo, as doenças que acometem os tecidos peri-implantares também têm sido correlacionadas ao acúmulo do biofilme e a especificidade bacteriana do mesmo (Mombelli et al., 1987; Schou et al., 1996; Mombelli et al., 2001; Shibli et al., 2003; Shibli et al., 2008).

1.2 Microbiologia da Peri-implantite – agente etiológico

O conceito de que microrganismos específicos atuam como agentes etiológicos nas infecções periodontais (gengivite e periodontite), resultando em perda óssea alveolar e perda de inserção clínica está bem estabelecido na literatura (Socransky et al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005; Shibli et al., 2008; Faveri et al., 2009; Kumar et al., 2012). Assim sendo e de forma similar, as doenças peri-implantares, no caso as peri-implantites, têm sido correlacionadas com o acúmulo do

biofilme bacteriano específico e consequente perda óssea alveolar ao redor do implante (Quirynen et al., 1992; Schou et al., 1992, 1996; Albrektsson e Isidor, 1994; Nociti Jr et al., 2001; Shibli et al., 2003). As primeiras evidências científicas que demonstraram uma relação direta entre o acúmulo do biofilme bacteriano e a mucosite e/ou peri-implantite foram provenientes de estudos realizados nos anos 80 e 90 (Rams e Link, 1983; Rams, 1984a; Rams et al., 1984b; Alcoforado et al., 1991). Estudos em modelo animal demonstravam que o uso de ligadura posicionada ao redor do implante (cabeça do implante) proporcionava um acúmulo de biofilme e consequentemente a perda óssea peri-implantar (Leonhardt et al., 1992; Pontoriero et al., 1994; Silverstein et al., 1994; Isidor, 1996; Schou et al., 1996; Eke et al., 1998; Shibli et al., 2003).

Assim sendo, a busca por diferenças microbiológicas existentes entre implantes saudáveis e implantes doentes e muitas vezes relacionando os mesmos com dentes sadios e/ou com periodontite se iniciou (Leonhardt et al., 1999; Shibli et al., 2008; Faveri et al., 2011). Rams e Link (1983) e Rams et al. (1984a) conduziram os primeiros estudos que, por meio da microscopia de contraste de fase e microscopia eletrônica, observaram diferenças existentes na forma das espécies bacterianas presentes no biofilme subgengival peri-implantar. Os autores avaliaram amostras de 17 implantes em 13 indivíduos, em função há no mínimo 6 meses, com diferentes tipos de formatos e observaram que os implantes saudáveis apresentaram uma microbiota formada predominantemente por cocos, enquanto os implantes perdidos apresentaram níveis significantemente elevados de espiroquetas. Mombelli et al. (1987), por meio de microscópio de contraste de fase e cultura microbiana, descreveram que nas amostras dos sítios de implantes com peri-implantite, 41% dos organismos cultiváveis eram bastonetes anaeróbios Gram-negativos e que esses níveis eram significantemente superiores nos sítios doentes em relação aos implantes bem sucedidos, predominou o grupo dos cocos anaeróbios facultativos. Becker e colaboradores (1990) avaliando as condições clínicas e microbiológicas de 36 implantes com peri-implantite demonstraram um aumento da mobilidade e perda óssea e a presença de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. George et al. (1994) avaliaram 98 implantes num total de 24 indivíduos e relataram que 62,5% dos indivíduos possuíam um ou mais implantes colonizados por importantes periodontopatógenos, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis*, enquanto somente 37,5% não

possuíam nenhum dos implantes colonizados por essas espécies. Os autores sugeriram que estas espécies, associadas às doenças periodontais, estariam mais presentes em implantes que exibem inflamação dos tecidos peri-implantares em relação aos implantes saudáveis. Assim sendo, vários estudos utilizando técnicas de microscopia e cultura microbiana corroboraram com estes achados iniciais (Pontoriero et al., 1994; Papaioannou et al., 1996; Bollen et al., 1996; Fardal et al., 1999; Lee et al., 1999; Listgarten e Lai, 1999).

A introdução dos métodos de biologia molecular no estudo da microbiota peri-implantar sedimentou novas e importantes informações em relação a etiologia das peri-implantites. Salcetti et al. (1997) por meio da técnica do “Checkerboard DNA-DNA hybridization”, avaliaram os níveis de 40 espécies bacterianas associadas à implantes doentes e implantes saudáveis. Foram avaliadas 21 amostras de sítios com peri-implantite e 8 amostras de implantes saudáveis. A prevalência de *Prevotella nigescens*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vicentii* e *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* foi显著mente superior nos implantes doentes em comparação aos saudáveis. Utilizando a mesma metodologia, Hultin et al. (2002) avaliaram os parâmetros clínicos e microbiológicos de 36 indivíduos, sendo 17 com peri-implantite e 19 com saúde peri-implantar. Os autores encontraram altos níveis de importantes periodontopatógenos, tais como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Além disso, níveis superiores a 10^6 células foram encontradas somente nos sítios com peri-implantite (controles saudáveis apresentaram sinais iguais ou inferiores à 10^5 células). Renvert et al. (2007) avaliaram por meio do “Checkerboard DNA-DNA hybridization” amostras de 976 implantes provenientes de 213 indivíduos com diagnósticos de saúde peri-implantar, mucosite e peri-implantite. Mucosite e peri-implantite foram diagnosticadas em 59% e 14,9% respectivamente, nos implantes selecionados. *Neisseria mucosa*, *F. nucleatum* sp. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* sp. *polymorphum* e *Capnocytophaga sputigena* foram as espécies dominantes nos sítios peri-implantares. O aumento da profundidade de sondagem obteve uma correlação com os níveis de *Eikenella corrodens* ($r=0,16$, $p<0,05$), *F. nucleatum* sp. *vincentii* ($r=0,15$, $p<0,05$), *P. gingivalis* ($r=0,14$, $p<0,05$) e *P. micra* ($r=0,17$, $P=0,01$). Os autores concluíram que apenas algumas espécies bacterianas diferiram entre a mucosite, a peri-implantite e a saúde peri-implantar. Posteriormente, Shibli et al. (2008) avaliaram sistematicamente a composição do

biofilme supragengival e subgengival de implantes com peri-implantite e com saúde peri-implantar. Em ambas as amostras supra e subgengivais, níveis elevados de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram observados nos sítios com peri-implantite em comparação aos sítios saudáveis ($p<0,05$). Além disso, a soma da proporção destas 3 espécies, denominadas de complexo vermelho (Socransky et al., 1998), estavam significantemente elevadas nos implantes doentes em relação aos saudáveis, enquanto por outro lado, a soma das espécies associadas à saúde estavam mais elevadas nos indivíduos com saúde peri-implantar. Os autores concluíram que o perfil microbiológico dos ambientes supra e subgengivais diferiram marcadamente dentro de cada grupo experimental. Existe um consenso entre os resultados alcançados pelos estudos realizados recentemente (Hultin et al., 2002; Leonhardt et al., 2003; Persson et al., 2006; Máximo et al., 2009; Tabanella et al., 2009; Kumar et al., 2012), os quais descrevem as lesões peri-implantares como infecções mistas e complexas, normalmente associadas à espécies Gram-negativas anaeróbias que também estão envolvidas com as periodontites.

1.2.1 Diversidade bacteriana

Segundo a taxonomia Lineana tradicional, baseada em dados morfológicos e fisiológicos, todas as formas de vida na Terra podem ser classificadas em 5 reinos: *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* e *Monera* (Whittaker, 1969). Além disso, pode-se também dividir a vida em dois tipos fundamentais: aqueles que possuem uma membrana nuclear (eucariotos) e aqueles que não a possuem (procariotos), de modo que a maior diversidade da vida na terra era devida aos Eucariotos, particularmente às suas formas multicelulares (Whittaker, 1969). Os procariotos (Reino Monera) eram considerados simples, primitivos e relativamente uniformes em suas características (Hugenholtz e Pace, 1996). Esses sistemas perduraram até 1990 quando Carl Woese utilizou as comparações de sequências de 16S e 18S rRNA para propor uma nova classificação universal para a grande diversidade existente no meio ambiente. Pela primeira vez uma proposta completa de classificação foi feita baseada em dados moleculares e não morfológicos (Woese et al., 1990). Os autores propuseram a criação de um novo nível taxonômico, denominado Domínio, sendo a vida no planeta dividida em três Domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eucarya*, uma vez que o sistema de 5 Reinos era insuficiente e não

refletia a filogenia natural dos seres vivos. Desta forma, estudos avaliando a diversidade de microrganismos presentes nestes domínios em diferentes ambientes tiveram inicio (Giovanonni et al., 1990; Zhu et al., 2003; An, Dong e Dong, 2005; Faveri et al., 2011; Kumar et al., 2012; Siggins et al., 2012). O termo diversidade para a biologia é geralmente utilizado para descrever o número de espécies presentes em um habitat. Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de sequências de DNA encontradas em um ambiente (Hunter-Cevera, 1998).

Inúmeros métodos têm sido utilizados para a identificação dos microrganismos bucais. As técnicas de microscopia de contraste de fase e de campo escuro podem demonstrar diferenças de tamanho, forma e motilidade dos microrganismos presentes no biofilme dental. Porém, estes métodos microscópicos não diferenciam as espécies bacterianas (Loesche et al., 1985; Beltrami et al., 1987; Omar et al., 1990; Dahan et al., 2004). O método de cultura, considerado o “padrão-ouro”, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes no biofilme dental, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana a diferentes antibióticos (Ali et al., 1992; Lie et al., 1995). Entretanto, estima-se atualmente que a cavidade bucal apresente aproximadamente 700 espécies de bactérias, sendo que mais de 40% destas espécies ainda não foram cultivadas (Dewhirst et al., 2010). Assim, outros microrganismos poderiam estar associados às doenças periodontais, embora muitos não tenham sido ainda cultivados e caracterizados (Paster et al., 2001; Hughes et al., 2001; Kumar et al., 2005; Sanz e Winkelhoff, 2011). Para determinar a diversidade bacteriana, sem a necessidade do cultivo dos microrganismos, foram desenvolvidos métodos baseados na extração do DNA da amostra, amplificação da região do gene *16S rRNA* com a utilização de iniciadores universais, clonagem do amplicon em plasmídeo inserido em *Escherichia coli* e posterior sequenciamento genético (Hugenholtz e Pace, 1996; Hugenholtz et al., 1998; Paster et al., 2001; Kazor et al., 2003; Kumar et al., 2005; Faveri et al., 2008; Wade, 2011). Esta metodologia vem sendo utilizada em inúmeros estudos de Metagenômica em vários ambientes, incluindo a cavidade bucal (Kazor et al., 2003; Faveri et al., 2008, 2011; Colombo et al., 2009; Dewhirst et al., 2000, 2010; Koyanagi et al., 2010; Casarin et al., 2012; Kumar et al., 2012).

Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos (Wade, 2011; Diaz et al., 2012). Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaria*. Os genes dos *rRNA* em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais, grandes porções nos genes *rRNA* são bem conservadas e suas sequências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. Variações nas sequências dos nucleotídeos do gene de *rRNA* são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S, 18S e 23S *rRNA* revelaram separação dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaria*. O gene 16S *rRNA* é uma das moléculas que compõe a subunidade menor do ribossomo nos domínios *Archaea* e *Bacteria*. Investigações utilizando esta metodologia em amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica, demonstraram a presença de novos filotipos de bactérias que poderiam estar associados à periodontite crônica (Sakamoto et al., 2006; Paster et al., 2001; Kumar et al., 2003; Kumar et al., 2005; Faveri et al., 2008). O termo “filotipo”, usado no lugar de “espécie” se refere às semelhanças nas sequências do 16S *rRNA* clonadas; a denominação formal “espécie” requer uma completa descrição das características fenotípicas de um organismo (Paster et al., 2001). Poucos foram os estudos que avaliaram a diversidade bacteriana presente em sítios peri-implantares (Koyanagi et al., 2010; Kumar et al., 2012).

Em estudo realizado por Koyanagi et al. (2010), os autores avaliaram sítios acometidos por peri-implante e periodontite e sítios com saúde periodontal através da clonagem do gene 16S *rRNA* para determinar a diversidade bacteriana nesses sítios. Participaram do estudo três indivíduos apresentando sítios com peri-implantite, implante saudável e periodontite, dos quais foram coletadas amostras subgengivais com cones de papel. Um total de nove sítios foram coletados, mas apenas 8 foram analisados (a amostra de um sítio de implante saudável foi perdida durante o processamento), dos quais foram obtidas 355 sequências que revelaram a presença de 112 espécies (51 espécies representavam filotipos ainda não cultivados, dos quais 22 eram novos). A microbiota da peri-implantite incluiu, primariamente, espécies Gram-negativas anaeróbias e apresentou uma composição

mais diversa do que a dos sítios de periodontite e saúde peri-implantar. Foi detectado nos sítios com peri-implantite os filos *Chloroflexi*, *Tenericutes* e *Synergistetes*, além de *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Solobacterium moorei*. *Fusobacterium nucleatum* foi identificado em todos os sítios com peri-implantite e *Granulicatella adiacens* em dois terços desses sítios, sendo essas duas espécies também encontradas nos sítios com doença periodontal. Bactérias previamente estabelecidas como periodontopatogênicas demonstraram uma baixa prevalência nos sítios com doença peri-implantar enquanto outras bactérias foram identificadas como candidatas a patógenos na peri-implantite.

Kumar et al. (2012) examinaram a diversidade microbiana associadas com saúde e doença em dentes e implantes através do pirosequenciamento 16S e filogenética computacional. Participaram do estudo dez indivíduos por grupo (peri-implantite, periodontite crônica, saúde periodontal e saúde peri-implantar), dos quais amostras foram coletadas com cones de papel do sulco, bolsa periodontal e fenda peri-implantar. As sequências geradas pelo pirosequenciamento das amostras representaram os filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *TM7*, *OP11* e *Synergistes*; com o *Firmicutes* contando com 53,4% de todas as sequências. Representaram, também, 84 gêneros e os filotipos não-cultivados contaram com uma média de $52,6 \pm 5,3\%$ do biofilme subgengival saudável e $44,6 \pm 3,5\%$, $77,8 \pm 3,9\%$ e $48,4 \pm 7,7\%$ dos biofilmes periodontal, implante saudável e peri-implantite, respectivamente. Os implantes saudáveis apresentaram os níveis mais altos de Gram-negativos anaeróbios e a menor abundância dos Gram-positivos aeróbios quando comparado com os demais grupos. Os sítios com peri-implantite apresentaram níveis significantemente baixos dos gêneros *Leptotrichia*, *Propionibacter* e *Prevotella* e altos níveis de *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus* não-*mutans*, *Butyrivibrio* e *Streptococcus mutans* quando comparados com os implantes saudáveis. As maiores diferenças foram observadas entre implantes saudáveis e os dentes. Implantes saudáveis apresentaram altos níveis de *Prevotella*, *Treponema*, *Leptotrichia*, *S. mutans*, *Butyrivibrio*, *Catonella*, *Propionibacter* e *Lactococcus* e baixos níveis de *Athrobacter*, *Synergistes*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Dialistes*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* e *Streptococcus* não-*mutans* quando comparado com os dentes. Certos gêneros importantes na etiologia da periodontite,

nominalmente *Treponema*, *Prevotella*, *Campylobacter* e *Eubacterium* também são membros dominantes da microbiota associada com a peri-implantite. Algumas linhagens não usuais, tais como *Butryvibrio fibrisolvens* e *S. mutans* foram encontradas em abundância na bolsa peri-implantar, bem como numerosas espécies pertencentes aos gêneros *Peptococcus*, *Mycoplasma*, *Anaerococcus*, *Anaerovorax*, *Anaerofilum*, *Burkholderia* e *Exiguobacterium*. Os autores apontam que os dados de sua pesquisa indicam que embora certas bactérias ligadas à doença periodontal possam ser encontradas na peri-implantite, o perfil microbiano das comunidades peri-implantares diferem do perfil subgengival de várias maneiras.

2 OBJETIVO

Determinar a diversidade bacteriana presente no biofilme subgengival de indivíduos com peri-implantite e com saúde peri-implantar pela técnica de Sanger de clonagem e sequenciamento genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da população

Foram selecionados 20 indivíduos adultos (idade ≥ 21 anos), sendo 10 indivíduos portadores de implantes que apresentavam sinais clínicos e radiográficos de peri-implantite (grupo teste) e 10 indivíduos portadores de implantes saudáveis (grupo controle). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e forma de coleta de amostras. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O protocolo de estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

3.2.1 Critérios de inclusão

Grupo Teste – Peri-implantite

Foram selecionados indivíduos que apresentassem pelo menos uma prótese implanto-suportada, utilizando implantes de superfície lisa (titânio comercialmente puro) sob função há no mínimo 1 ano e que exibissem sinais clínicos de peri-implantite, bem como uma prótese implanto-suportada que apresentasse saúde peri-implantar e um mínimo de 10 dentes periodontalmente saudáveis. Os implantes eram diagnosticados com peri-implantite se exibissem sangramento à sondagem e/ou supuração, profundidade de sondagem ≥ 5 mm; perda óssea radiográfica > 3 mm e defeito ósseo em forma de cálice (Mombelli 1999; Shibli et al. 2008). Por outro lado, os implantes foram diagnosticados com saúde peri-implantar caso não apresentassem profundidade de sondagem ≥ 3 mm e sangramento à sondagem e não apresentassem sinais clínicos de mucosite peri-implantar.

Grupo controle – saúde peri-implantar

Foram selecionados indivíduos que apresentassem pelo menos uma prótese implanto-suportada, utilizando implantes de superfície lisa (titânio comercialmente

puro) sob função há no mínimo 1 ano que apresentassem sinais clínicos de saúde peri-implantar e um mínimo de 10 dentes periodontalmente saudáveis. Os implantes foram categorizados com saúde peri-implantar caso não apresentassem profundidade de sondagem > 3 mm, sangramento à sondagem e ausência de sinais clínicos de mucosite peri-implantar.

3.2.2 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram respeitados, sendo excluídos indivíduos:

- Fumantes;
- grávidas ou lactantes;
- indivíduos totalmente edêntulos;
- indivíduos com periodontite crônica e/ou agressiva (nenhum sítio com profundidade de sondagem superior a 3 mm);
- indivíduos com gengivite (não apresentar mais que 10% de sítios com sangramento gengival);
- uso de antibióticos sistêmicos nos últimos 12 meses;
- ter se submetido a tratamento periodontal ou peri-implantar nos últimos 6 meses
- uso periódico de antissépticos bucais nos últimos seis meses;
- história de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, hepatite, diabetes e desordens imunes.

3.3 Avaliação clínica

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste. Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros:

- Índice de placa visível - IPV (Ainamo e Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes.

- Índice de sangramento gengival – ISG (Ainamo e Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival.
- Profundidade de sondagem – PS: distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.
- Nível clínico de inserção - NCI: distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cemento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.
- Sangramento à sondagem - SS: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada.
- Supuração: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada.

Para a avaliação dos implantes, foram utilizados os índices modificados (Mombelli e Lang, 1994).

3.4 Seleção dos sítios testes

Nos indivíduos do grupo Teste foram selecionados um implante com peri-implantite e um implante com saúde peri-implantar, caso o indivíduo apresentasse mais de um implante com estas condições, o implante localizado na posição mais anterior era selecionado. Nos indivíduos do grupo controle o implante com saúde periodontal localizado na posição mais anterior foi selecionado. Desta forma, foram selecionados 30 amostras de biofilme subgengival.

3.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival a coleta de amostras de biofilme subgengival foi realizada com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL (tubo 1) contendo 50 µL de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). Imediatamente após a coleta das amostras, estas foram homogeneizadas por 1 minuto em agitador de tubos e armazenadas à -80°C até serem analisadas. Não foram coletadas amostras de implantes que apresentassem mobilidade.

3.5 Análise microbiológica

Análise da diversidade do Domínio Bacteria por sequenciamento do gene 16S rRNA pelo método de Sanger.

3.5.1 Extração de DNA

O tubo contendo 50 μ L da amostra foi utilizado para extração do DNA por meio do kit Epicentre Masterpure DNA & RNA Purification (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O tubo contendo a amostra foi retirado do freezer -80°C e mantido em gelo por 10 minutos para descongelamento. O tubo coletor foi agitado no agitador de tubos por 1 minuto e a solução foi transferida para um novo tubo. Para a lise do material coletado, adicionou-se 1,0 μ L de solução de proteinase K (50 μ g/ μ L) aos 50 μ L da solução de TE da amostra, e posteriormente incubado a 65°C, por 15 minutos. As amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos, sendo adicionado em seguida 175 μ L MCP reagente para precipitação de proteínas e centrifugação por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 500 μ L de isopropanol 100%, os tubos foram agitados por 2 minutos e, após essa etapa, os tubos passaram por nova centrifugação por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e os precipitados formados foram lavados duas vezes com etanol 70%. Os precipitados foram secos por 10 minutos e, após esse tempo, ressuspensos em 25 μ L TE e armazenado à -80°C.

3.5.2 Amplificação da região 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA das amostras foi utilizado como molde em duas reações de PCR para amplificação da região 16S rRNA utilizando os iniciadores universais propostos por Colombo et al. (2009). Na primeira reação de PCR foram associados na proporção de 1/1 dois “forward primer” (4F 5'-CAGAGTTGATYMTGGC-3’ e 6F 5'-GACTAGAGTTGATYMTGGC-3’) e um “reverse primer” (1541R 5'-GAAGGAGGTGWTCCADCC-3’). Para esta reação foram utilizados: 1 μ L de DNA molde, 0,2 μ L de Platinum Taq polimerase (5 unidades/ μ L, Invitrogen), 5 μ L de tampão (10X), 0,5 μ L de dNTPs (10nM) , 1 μ L de uma solução de cada iniciador (5 pmoles/ μ L), 1,5 μ L de cloreto de magnésio (50 mM) e 14,8 μ L água Milli Q estéril q.s.p. para uma solução final de 25 μ L. Para a segunda reação de PCR, foram

utilizados os mesmos “forward primer” descritos anteriormente e o seguinte “reverse primer”: 1492R (5'-GYTACCTTGTACGACTT-3'). Para esta reação foram utilizados: 1 μ L de DNA molde, 0,2 μ L de Platinum Taq polimerase (5 unidades/ μ L, Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 5 μ L de tampão (10X), 0,5 μ L de dNTPs (10nM), 1 μ L de uma solução de cada iniciador (15 pmoles/ μ L para “forward” e 5 pmoles/ μ L para “reverse”), 1,5 μ L de cloreto de magnésio (50 mM) e 14,8 μ L água Milli Q estéril q.s.p. para uma solução final de 25 μ L. Os produtos das duas reações de PCR foram combinados resultando em um produto de 50 μ L das reações de amplificação para cada amostra.

As reações de amplificação foram realizadas segundo as seguintes condições (Colombo et al., 2009): desnaturação inicial a 94°C por 120 segundos, seguindo-se 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos, com 1 segundo adicional para cada ciclo e uma extensão final de 10 minutos a 72°C em termociclador (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE, Tris acetato a 40mM, ph 8,5; EDTA a 2mM) e corados com SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os fragmentos específicos contendo 1500 pb foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta.

3.5.3 Clonagem

Após a determinação da presença do amplicon, descritos no item 3.5.2 (*Amplificação da região 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase*) estes foram clonados em *E. coli*. Para a clonagem utilizou-se o kit comercial TOPO TA Cloning - Version P (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos obtidos através da reação de PCR foram ligados ao vetor TOPO. A seguir, as células quimiocompetentes de *E.coli* TOPO foram transformadas por choque térmico e o meio S.O.C. (2% Triptone, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCL, 2,5 mM KCL, 10mM MgCL₂, 10mM MgSO₄, 20 mM glucose) foi adicionado em seguida. As células foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Luria-Bertani acrescido de 50 μ g/mL de Canamicina e posteriormente incubadas a 37° C

por 24hs. As colônias recombinantes foram transferidas para tubos contendo 40µL de tampão TE e mantidas a -80°C até o momento do processamento.

Foram selecionadas 50 colônias por amostra clonada, as quais foram utilizadas em uma reação de PCR contendo 1µL de cada amostra para determinar o tamanho correto dos insertos. Para cada reação de amplificação da região 16S rRNA de microrganismos procariotas foram utilizados forward *primers* M13 (-40) e M13 reverse primer (KIT TOPO). As condições da reação foram as mesmas já descritas no item 3.5.2 (*Amplificação da região 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase*). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE, Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM) e corados com SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os fragmentos específicos foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta. Após a amplificação do fragmento, os produtos das reações 16S rRNA foram purificados por meio do Microcon 100 (Amicon, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e pelo QIAquick PCR purification kit (Qiagen North American Holdings Inc., Germantown, MD, USA).

3.5.4 Sequenciamento

Após a purificação dos produtos das reações 16S rRNA, foram realizadas reações utilizando o kit de sequenciamento ABI Prism (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit with AmpliTaq DNA Polymerase FS; Perkin-Elmer). Foram utilizadas as bases fluorescentes (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com 80 µM de primers (533R) e como DNA molde 1µL do produto de PCR purificado em volume total de 20µL por reação. Os ciclos de sequenciamento foram realizados no sequenciador ABI 9700 PCR (AME Bioscience Ltda, Norway), com 25 ciclos de desnaturação a 96°C (10s) e anelamento e extensão a 60°C (4 minutos). Os segmentos de DNA obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados com o auxílio do sequenciador ABI 377 DNA (DNASTAR Inc, Madison, EUA).

3.5.5 Análise dos dados dos 16S rRNAs sequenciados

Cerca de 50 clones de cada amostra com o tamanho certo do inserto em 30 amostras foram analisadas. Uma sequência de aproximadamente 500 pares de base foi obtida por clone para determinar e identificar a posição filogenética do microrganismo (Paster et al., 2001; Faveri et al., 2008). A sequência de DNA obtida foi comparada com sequências 16S rRNA em banco de genes (GenBank) e no banco de dados do Forsyth Institute (www.homd.org). Os dados foram inseridos em um software (TREECON, Microsoft Windows) e árvores filogenéticas (dendrograma) foram construídas segundo a metodologia preconizada por Paster e Dewhirst (1988). As matrizes de similaridade foram corrigidas para a mudança de bases pelo método descrito por Jukes e Cantor (1969).

3.5.6 Análise Estatística

A porcentagem média dos sítios com placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem (SS) e supuração, bem como as médias de boca toda da profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, para cada grupo. As diferenças significantes entre os dois grupos para idade e parâmetros clínicos foram avaliadas através do Teste-t de Student. O teste Qui-quadrado foi aplicado para a variável gênero.

A média do número de clones presentes em cada filo, bem como em cada gênero foi computado por indivíduo e então avaliado para cada grupo. Uma transformação da variância descrita previamente por Shchipkova et al. (2010) foi utilizada para a proporção de cada espécie no biofilme subgengival em todas as amostras para criar uma distribuição normal dos dados. A proporção (p) de cada espécie na comunidade do indivíduo foi expressa como sendo $X = \sin^{-1}(\sqrt{p})$. As diferenças significantes entre o Grupo Controle e o implante saudável e implante com peri-implantite no Grupo Teste foram analisadas através do Teste-t de Student. As diferenças significantes entre as amostras do Grupo Teste foram avaliadas usando o Teste-t de Student pareado. O nível de significância considerado foi de 5%.

Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing

Ennyo S. Crispim da SILVA, Magda FERES, Luciene Cristina FIGUEIREDO, Jamil Awad SHIBLI, Fernanda Sampaio RAMIRO, Marcelo FAVERI

Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil.

Running head: Microbial diversity in peri-implantitis subjects.

Address for correspondence (*fax number and e-mail can be published*)

Marcelo Faveri
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa-CEPPE
Universidade Guarulhos
Praça Tereza Cristina, 229 Centro
07023-070 Guarulhos, SP, Brazil
e-mail: mfaveri@prof.ung.br

Abstract

Background and Objective: To examine the microbial diversity associated with peri-implant health and disease, and to identify differences between the bacterial communities in these clinical conditions by using Sanger sequencing. **Material and Methods:** Twenty subjects were assigned into a Control group consisting of subjects with healthy implants; and a Test group, consisting of subjects with peri-implantitis sites, as well as a healthy implant (n=10/group). In the Test group, subgingival biofilm samples were taken from the deepest sites of the diseased implant. In both groups, samples were collected from one site around a healthy implant. DNA was extracted and the 16S rRNA gene was amplified with universal primer pairs for Bacteria, sequenced, and the phylotypes were identified by comparison with known 16S rRNA sequences. **Results:** The phylogenetic identity of 1,387 16S rRNA gene clones was determined. Healthy implants demonstrated higher proportions of *Actinomyces*, *Atopobium*, *Kingella* and *Rothia* and lower levels of *Desulfobulbus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Filifactor*, *Mitsukella*, *Porphyromonas*, *Parvimonas* and *Pseudoramibacter* ($p<0.05$). *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister invisus*, *Streptococcus HOT 064*, *Filifactor alocis* and *Mitsuokella sp. HOT 131* presented a higher mean proportion, while *Veillonella dispar*, *Actinomyces meyeri*, *Granulicatella adiacens* showed lower mean proportions in the periimplantitis sites when compared with healthy implants in both the Control and Test groups ($p<0.05$). **Conclusion:** Striking differences were observed in the composition of subgingival biofilm between healthy and diseased implants. The microbiota associated with periimplantitis was comprised of more pathogenic bacterial species from the orange complex, as well as “unusual” species such as *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* and *Mitsuokella sp. HOT 131*.

Introduction

Endosseous dental implants have been a widely accepted therapy option for tooth replacement. Although several reports have described a high survival implant rate (Fiorellini, Martuscelli & Weber, 1998; Ferrigno et al. 2002; Albrektsson & Donos, 2012), infections in the periimplant tissue have been frequently reported (Jepsen et al. 1996, Renvert et al. 2007, Lindhe & Meyle 2008). Peri-implant mucositis describes a lesion resulting from an inflammatory reaction induced by bacteria that reside in the mucosa around the implant (Lindhe & Meyle 2008). Peri-implantitis is characterized by changes in the level of the crestal bone in conjunction with bleeding on probing, with or without concomitant deepening of peri-implant pockets (Mombelli & Lang, 1998; Heydenrijk et al. 2002). Recent evidence has indicated that this condition is rather prevalent, occurring in 20% of subjects and 10% of implant sites, from 5 –10 years after implant placement (Mombelli, Müller & Cionca, 2012).

Microbiological studies have shown that biofilm associated with implant failures differs substantially from that of healthy implants (Mombelli & Mericske-Stern 1990, Sanz et al. 1990, Leonhardt et al. 1999, Hultin et al. 2002, Botero et al. 2005, Quirynen et al. 2006, Renvert et al. 2007, Shibli et al. 2008). In humans, the subgingival biofilm of dental implants with clinically healthy marginal peri-implant tissues (Mombelli et al. 1987; Lee et al. 1999; Renvert et al. 2007; Shibli et al. 2008; Máximo et al. 2009) have demonstrated a microbiota dominated by a high proportion of coccoid cells, a low proportion of anaerobic and Gram-negative species and a low prevalence of periodontopathogenic bacteria. In contrast, a peri-implantitis pocket seems to harbor a microbiota similar to that found in periodontitis, such as *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Becker et al. 1990; Mombelli, 1993; Hultin et al. 2002; Leonhardt, Dählen & Renvert, 2003; Quirynen et al. 2006; Shibli et al. 2008; Kumar et al. 2012). Therefore, it is assumed that the same pattern of colonization that occurs in healthy periodontal tissues or in periodontal disease may occur around the subgingival surface of dental implants. This is important information and has direct clinical implications as the treatment proposed for peri-implant disease has been based on this microbial similarity.

The use of 16S ribosomal gene sequence analysis has provided new insights into the diversity of the oral microbiota related to periodontal health and disease (Paster et al. 2001, Faveri et al. 2008, Li et al. 2010, Shchipkova et al. 2010). A more

comprehensive examination of the taxonomically heterogeneous community associated with periodontitis has been provided using these new techniques. This knowledge has been recently extended to periimplantitis. Kumar et al. (2012) used pyrosequencing of PCR-amplified 16S rDNA from subgingival biofilm samples of subjects with periimplantitis and observed a relatively low microbial diversity associated with these periimplant infections. Apparently, this diversity was much lower than that observed in periodontal disease (Paster et al. 2001, Faveri et al. 2008, Li et al. 2010, Shchipkova et al. 2010). The authors concluded that periimplantitis is a microbial heterogeneous infection with predominantly Gram-negative species; however it appears to be less complex than periodontitis.

Accurate microbial diagnosis of an infectious disease is a critical step in order to establish effective therapeutic strategies. Therefore, the purpose of the present investigation was to examine the microbial diversity associated with peri-implant health and disease, and to identify differences between the bacterial communities in these clinical conditions by using Sanger sequencing.

Material and methods

Subject population

Twenty systemically healthy subjects were selected from the population referred to the Oral Implantology Clinic of Guarulhos University (Guarulhos,SP, Brazil). Their medical and dental histories were obtained and a full-mouth periodontal and implant examination was performed. Based on these data, the periimplantar diagnosis was made, and subjects who fulfilled the inclusion/ exclusion criteria were invited to participate in the study. The study protocol was explained to each subject, and a signed informed consent was obtained. This study protocol was approved previously by Guarulhos University's Ethics Committee in Clinical Research.

The subjects were assigned to two groups: Control (n=10) - subjects with at least one healthy dental implant and at least 10 periodontally healthy teeth; and Test (n=10) - subjects with at least one dental implant with periimplantitis, one healthy implant and at least 10 periodontally healthy teeth. Periimplantitis was characterized by saucer-shaped osseous defects > 3 mm, probing depth ≥ 5 mm and an inflamed periimplant mucosa exhibiting bleeding on probing and/or suppuration (Mombelli 1999, Shibli et al. 2008).

Exclusion criteria

Subjects were excluded if they were totally edentulous, had an implant with a coated surface; moderate to severe chronic and/or aggressive periodontitis [i.e., suppuration and/or bleeding on probing in more than 30% of the subgingival sites or any site with probing depth (PD) $\geq 4\text{mm}$]; had taken antibiotics within 12 months before the clinical examination; had received periodontal or periimplant therapy within 6 months; had a chronic medical disease or condition, or if they were smokers, pregnant or lactant.

Clinical and radiographic examination

Visible plaque (0/1), gingival bleeding (0/1), bleeding on probing (BOP, 0/1), suppuration (0/1), probing depth (PD, mm) and clinical attachment level (CAL, mm) were measured at six sites per implant (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual). PD and CAL measurements were recorded to the nearest millimeter using a North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). All the clinical examinations were performed by one trained and calibrated examiner

Microbiological examination

Sample collection

In the Test group the peri-implant site with the deepest pocket depth ($\text{PD} \geq 5\text{mm}$) was selected for sampling. If two or more sites presented similar pocket depth values, the more anterior site was chosen. Another sample was collected from the mesial site of a healthy dental implant ($\text{PD} < 3\text{ mm}$; negative bleeding on probing) within the same subject. Samples from the mesial surface of a healthy dental implant ($\text{PS} < 3\text{ mm}$; negative bleeding on probing) were collected from each subject of the Control group. After the clinical parameters had been recorded, the supragingival plaque was removed and subgingival biofilm samples were taken with individual sterile Gracey curettes and immediately placed in separate polypropylene tubes containing 50 μl TE [10 mm Tris–HCl, 1 mm ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.6].

Bacterial lysis

Extraction of DNA from all samples was performed using a Masterpure DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI). Cells were pelleted by centrifugation at 3500 r.p.m. for 10 min. After the supernatant was discarded, the pellet contained in 25 µl TE was resuspended by vortex mixing. One microliter of proteinase K (50 µg µl⁻¹) and 300 µl of tissue and cell lysis buffer (provided by the manufacturer) were added and the solution was incubated in a 65°C waterbath for 15 min. After 5 min in ice, 175 µl MCP protein precipitation reagent (provided by the manufacturer) was added to each sample. The debris was pelleted by centrifugation at 12,000 r.p.m. for 10 min. The supernatant was transferred to a new tube and 500 µl isopropanol was added. Tubes were mixed by inversion for 2 min and the DNA was pelleted by centrifugation at 12,000 r.p.m. for 10 min at 4°C. After carefully pouring off the isopropanol, pellets were rinsed twice with 70% ethanol. Pellets were air dried for 10 min and resuspended in 35 µl TE buffer at 37°C for 10 min. The DNA from individual subgingival biofilm samples were measured with a spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE) at 260 nm wavelength and were kept at -80°C until the analysis was performed.

PCR amplification of universal 16S rRNA

The 16S rRNA genes of each sample were amplified in two separate PCRs using different primer sets in accord to Colombo et al. (2009). In the first PCR reaction, a mix of two forward primers at a 1:1 ratio (4F: 5'-CCAGAGTTGATYMTGGC-3' and 6F: 5'-GACTAGAGTTGATYMTGGC-3') and the reverse primer 1541R (5'-GAAGGAGGTGWTCCADCC-3') (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) were used. One microliter of the DNA template was added to a reaction mixture (25 µl, final volume) containing 5 pmol of the 4F and 6F primer mix, 15 pmol of the 1541R primer, 2.5 µl 10× high-fidelity PCR buffer, 2 mM MgSO₄, 0.5 µl deoxynucleotide triphosphate mixture (10 mM), and 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). In the second PCR amplification, the forward primer mix described above and the 1492R reverse primer (5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3') were used. One microliter of the DNA template was added to a reaction mixture (25 µl final volume) containing 15 pmol of the forward primer mix, 5 pmol of the 1492R primer, 2.5 µl 10× high-fidelity PCR buffer, 2 mM

MgSO₄, 0.5 µl deoxynucleotide triphosphate mixture (10 mM, 0.2 mM final concentration of each deoxynucleotide), and 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). PCR was performed in thin-walled tubes with Peltier Thermal Cycles PTC-200 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) and included an initial denaturation step at 94°C for 2 minutes, followed by 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, elongation at 68°C for 1.5 minutes, with an additional 1 second for each cycle, and a final elongation step at 68°C for 10 minutes. The PCR products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel (Gibco, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) in Tris Acetate EDTA (TAE) buffer (Tris acetate 40mM, pH 8.5; EDTA 2mM), stained with SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) and visualized under short-wavelength UV light (Pharmacia Biotech, UV20, San Francisco, CA, USA). The PCRs were combined for each sample, providing a 50µl PCR product.

Cloning procedures

Cloning of PCR-amplified DNA was performed using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) according to the manufacturer's instructions. Fifty clones per sample were selected. The sizes of the inserts were determined in a PCR using an M13 (-20) forward primer and an M13 reverse primer (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Before sequencing of the fragments, the PCR-amplified *16S rRNA* gene fragments were purified and concentrated according to Paster et al. (2001).

16S rRNA sequencing

Sequencing was performed with ABI Prism fluorescent bases (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit with AmpliTaq DNA Polymerase FS; Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) using 80 µm reverse primers (Faveri et al. 2008) and 1.5 µl purified PCR product in a final volume of 20µL. Cycle sequencing was performed with a GeneAmp PCR system 9700 (AME Bioscience Ltda, Norway) with 25 cycles of denaturation at 96°C for 10 s, annealing at 55°C for 5 s, and extension at 60°C for 4 min. The sequencing reactions were run on an ABI 377 DNA sequencer (DNASTAR Inc, Madison, EUA).

16S rRNA sequencing and data analysis of unrecognized inserts

A sequence of approximately 500 bases was obtained to determine identity or approximate phylogenetic position. For identification on the closest relatives, the sequences of unrecognized inserts were compared with the 16S rRNA sequences of over 10,000 microorganisms in our database and over 100,000 sequences in the Ribosomal Data Project and GenBank. A level of 98.5% sequence identity was used as the cut-off point for identification of a specific taxon. Similarity matrices were constructed from the aligned sequences corrected for multiple base changes at a single position using Jukes and Cantor's method. Chimeric sequences were identified using the Chimera Check program in Ribosomal Database Project (RDP), by treeing analysis, and by base signature analysis.

Data management and statistical analysis

The mean percentage of sites with visible plaque, gingival bleeding, BOP and suppuration, as well as mean full-mouth PD and CAL and mean sample sites PD and CAL were computed for each subject and then averaged across subjects in both groups. The significance of differences between the two groups for age and the clinical parameters was sought using the Student's *t*-Test. Chi-square test was employed to compare the differences in the frequency of gender.

The mean number of clones present in each bacterial phylum, as well as in each bacterial genera was computed for each subject and then averaged across subjects in both groups. A variance stabilizing transformation described previously by Shchipkova et al. (2010) was used for the proportion of each species in the subgingival biofilm in all samples to create normal distribution of the data. The proportion (*p*) of each species in the community of each subject was expressed as $X = \sin^{-1} (\sqrt{p})$. The significance of differences between the Control group and the healthy implant and the implant with periimplantitis in the Test group was sought using Student's *t*-Test. The significance of differences within samples in the Test group was assessed using paired Student's *t*-Test. The level of significance was set at 5%.

Results

The demographic characteristics and clinical parameters of the studied population and the sampled sites are presented in Table 1 and 2, respectively. A total

of twenty subjects with a healthy implant ($n=10$) and an implant with periimplantitis ($n=10$) participated in this investigation. In the full-mouth data, no statistically significant differences were observed between groups for any clinical parameter ($p>0.05$), except for mean CAL, which was significantly higher in the Test group (Table 1; $p<0.05$). The mean PD and CAL measurements and the percentage of sites exhibiting plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration were higher in the diseased implants of the periimplantitis group in comparison with the healthy implants in both groups (Table 2).

The number of 16S rRNA clones available for identification ranged from 41 to 50 /sample in each group. The species detected fell into 8 bacterial phyla, namely the *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes* and *TM7*. The mean number of clones in each bacterial phyla in both groups is presented in Table 3. No differences were observed between healthy implants in the Control and Test groups ($p>0.05$); however, there were differences between the healthy implants from the Control and Test groups, as well as between healthy and diseased implants among subjects within the Test group ($p>0.05$). Healthy implants from the Control and Test groups presented a significantly higher mean number of clones from the phylum *Actinobacteria* in comparison with implants with periimplantitis. On the other hand, diseased implants showed a higher mean number of clones of the phylum *Bacteroidetes* in comparison with the Control group ($p<0.05$). Uncultivated phylotypes accounted for an average of $32.1 \pm 5.3\%$ (mean \pm standard error) and $35.8 \pm 6.1\%$ of the biofilm of healthy implants in the Control and Test groups, respectively, and $41.2 \pm 3.5\%$ of periimplantitis. No differences were observed between groups in the mean proportion of not-yet-cultivated bacterial species ($p>0.05$).

Figure 1 shows the mean proportions of the bacterial genera presented in the Control and Test groups. All the samples taken together had forty-four genera. Only 3 genera presented significant differences between healthy implants in both groups (e.g., *Catonella*, *Eubacterium* and *Kingella*), while 13 genera presented significant differences between healthy implants in the Control group when compared with those with periimplantitis. Healthy implants demonstrated higher proportions of *Actinomyces*, *Atopobium*, *Capnocytophaga*, *Rothia* and *Kingella*, and lower levels of *Desulfobulbus*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Filifactor*, *Mitsukella*, *Parvimonas*, *Porphyromonas* and *Pseudoramibacter* ($p<0.05$). Several genera showed statistically

significant differences between a healthy implant and an implant with periimplantitis within Test group, such as *Actinomyces*, *Bacteroidetes*, *Desulfobubus*, *Dialister*, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Mitsukella*, *Neisseria*, *Parvimonas* and *Porphyromonas*.

The TOP-40 phylotypes (i.e. the phylotypes with the highest values in both groups, considering the transformed X-value) are described in Table 4. Great differences were observed between healthy implants in the Control and Test groups when compared with implants with periimplantitis. *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter gracilis*, *Dialister invisus*, *Streptococcus HOT 064*, *Filifactor alocis* and *Mitsuokella* sp. HOT 131 presented a higher mean proportion, while *Veillonella dispar*, *Actinomyces meyeri*, *Granulicatella adiacens* showed lower mean proportions in the periimplantitis sites when compared with healthy implants in both the Control and Test groups ($p<0.05$). In addition, *Parvimonas micra* and *Prevotella intermedia* were found at higher mean levels in implants with periimplantitis in comparison with healthy implants in the Test group ($p<0.05$). No differences was observed between the mean proportions of Gram-positive and Gram-negative bacterial species between groups and within subjects in the Test group ($p>0.05$, data not show)

Discussion

It have been suggested that periimplantitis is associated with the imbalance between pathogenic and host-compatible bacterial species on the subgingival environment (Becker et al. 1990; Esposito et al. 1998; Tonetti et al, 1998; Hultin et al. 2002). Therefore, describing the microbial profile of different implant conditions is an important step to establish more specific treatments. To our knowledge, few studies to date have reported the bacterial diversity around implants with periimplantitis or healthy implants employing an open-ended tool (Kumar et al. 2012, Heuer et al. 2012, Faveri et al. 2011, Koyanagi et al. 2010). Thus, the main goal of the present study was to determine the bacterial diversity in subgingival biofilm samples from subjects with periimplantitis and directly compared them with healthy implants. The results showed that the biofilm present around periimplantitis present a different microbial composition when compared to healthy implants. Overall, the diseased implants presented strikingly reduced proportions of some beneficial bacterial species and increased proportions of putative pathogens, in comparison with the healthy implants.

Although several different microbial species inhabit the subgingival environment of diseased and healthy implants, some pathogenic bacterial species or

potentially important pathogens were found in higher levels and proportions in periimplantitis sites in comparison to the healthy ones. Periimplantitis sites presented higher proportions of some recognized periodontal pathogens from the orange complex (Socransky et al. 1998), such as *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia* and *Campylobacter gracilis*. Moreover, these sites presented significantly higher percentages of clones of *Desulfobulbus*, *Dialister*, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Mitsuokella* and *Porphyromonas* (Figure 1) in comparison with healthy implants. All of these species have been previously associated with periimplantitis/periodontitis (Sanz et al. 1990, Leonhardt et al. 1999, Shibli et al. 2008, Koyanagi et al. 2012). In addition, high proportions of some “unusual” species, such as *F. alocis*, *Dialister invisus* and *Mitsuokella* sp. HOT 131 were also detected in periimplantitis sites (Table 4). *F. alocis* is a fastidious, Gram-positive, obligate anaerobic rod that possesses trypsin-like enzymatic activity, similarly to *P. gingivalis* and *T. denticola* (Loesche 1986, Maiden et al. 1996), and it has been found in subjects with periodontitis (Paster et al. 2001, Kumar et al. 2005, Schlafer et al. 2010) and with endodontic infections (Siqueira et al. 2003). Schlafer et al. (2010) suggested that this species might be involved in coaggregation events that take place during the establishment and maturation of the biofilms and therefore, they may play a crucial role in biofilm formation (Rickard et al. 2003). *D. invisus* and *Mitsuokella* sp. HOT 131 (initially described as *Selenomonas* sp. oral clone CS002) have been previously found in higher numbers in the subgingival plaque of subjects with periodontitis compared with those with a healthy periodontium (Paster et al. 2001, Kumar et al. 2003, Kumar et al. 2005, Faveri et al. 2008, Gonçalves et al. 2012). Therefore, the role of these species in the pathogeneses of periimplantitis deserves further investigation.

The bacterial community associated with a healthy implant in both groups presented significantly higher proportions of species from the *Actinobacteria* phyla (Table 3) that included species from the genera *Actinomyces* (Figure 1). These results are in agreement with previous studies that have strongly associated these genera with periodontal health (Socransky et al. 1988, Colombo et al. 2002, López et al. 2004, Socransky & Haffajee 2005, Faveri et al. 2009), as well as a healthy periimplant mucosa (Shibli et al. 2008). *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces oris*, *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces* sp. HOT 416 and *Actinomyces* sp. HOT 181 was one of the TOP-40 species detected in both groups. The increased proportions of these genera has been suggested to associated with successful periodontal treatment (Socransky

et al. 1998, Faveri et al. 2009). However, these results are in contrast with Kumar et al. (2012) who found significantly higher proportions of these genera in periimplantitis than around healthy implants using pyrosequencing technique. Differences in the primer pairs and the sequencing technique used in both studies, as well as differences in the studied populations and on the microbial biofilm collection may have accounted for the conflicting results (de Lillo et al. 2006, Gerber et al. 2006, Diaz 2012).

Our results showed no differences between the mean proportion of Gram-positive and Gram-negative bacterial species between groups. Kumar et al. (2012) found the highest levels of gram negative anaerobes and lowest abundance of gram positive aerobes in healthy implants. These results are striking, since gram negative bacteria anaerobes are associated with diseased sites.

High proportions of clones in the phyla *Firmicutes* was seen in all experimental groups (Table 3). This phyla includes *Streptococcus* species and agrees with previously studies demonstrating over-representation of streptococci after Sanger cloning and sequencing methodology (Kroes et al. 1999), but are in contrast with Diaz et al. (2006) results.

It has been accepted that even healthy sites of subjects with periodontitis (probing depth \leq 3mm without bleeding on probing) present significantly higher mean levels and proportions of some of the most important periodontal pathogens, such as *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in comparison with healthy sites in periodontally healthy subjects (Riviere et al. 1996, Socransky & Hafajee et al. 2005, Faveri et al. 2009). However, this trend was not observed in the present study. Healthy implants in subjects with or without periimplantitis exhibited a similar bacterial similarity, i.e. a microbial profile compatible with periodontal/periimplantitis health. Only the proportion of *Catonna*, *Eubacterium* and *Kingella* differed between healthy implants in the Control and Test groups (Figure 1). However, these healthy profiles were very different from that observed in periimplantitis, which presented higher levels of some putative pathogens and lower of host-compatible species. Therefore, these results are in agreement with a previous study that suggested that, differently from periodontitis, periimplantitis might be a site-specific infection (Sanz et al. 1990).

Conclusion

Striking differences were observed in the composition of subgingival biofilm between healthy and diseased implants. The microbiota associated with peri-implantitis was comprised of more pathogenic bacterial species from the orange complex, including “unusual” species, such as *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* and *Mitsuokella sp.* HOT 131.

References

- Albrektsson, T. & Donos, N. (2012) Implant survival and complications. The Third EAO consensus conference 2012. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 63–65
- Becker, W., Becker, B.E., Newman, M.G. & Nyman, S. (1990) Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. **5**: 31-38.
- Botero, J.E., González, A.M., Ramiro, A.M., Olave, G. & Contreras, A. (2005) Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *Journal of Periodontology* **76**: 1490-1495.
- Colombo, A.P., Boches, S.K., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, V.D.T., Dewhirst, F. & Paster, B.J. (2009) Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology* **80**: 1421-1432.
- Colombo, A.P., Teles, R.P., Torres, M.C., Souto, R., Rosalém, W.J., Mendes, M.C. & Uzeda, M. (2002) Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **73**: 360-369.
- de Lillo, A., Ashley, F.P., Palmer, R.M., Munson, M.A., Kyriacou, L., Weightman, A.J. & Wade, W.G. (2006) Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral microbiology and immunology* **21**: 61-68.
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr & Kolenbrander PE. (2006) Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2837–2848.
- Diaz PI, Dupuy AK, Abusleme L, Reese B, Obergfell C, Choquette L, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Terzi E, Strausbaugh LD. Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol*. 2012; 27(3): 182-201

- Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998) Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Sciences* **106**: 527–551.
- Faveri, M., Mayer, M.P., Feres, M., Figueiredo, L.C., Dewhirst, F.E. & Paster, B.J. (2008) Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology* **23**: 112-118.
- Faveri, M., Figueiredo, L.C., Duarte, P.M., Mestnik, M.J., Mayer, M.P. & Feres, M. (2009) Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 739-749.
- Faveri, M., Gonçalves, L.F., Feres, M., Figueiredo, L.C., Gouveia, L.A., Shibli, J.A. & Mayer, M.P. (2011) Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri-implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. *Journal of Periodontal Research* **46**: 338-344.
- Ferrigno, N., Laureti, M., Fanali, S. & Grippaudo, G. (2002) A long-term follow-up study of non-submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 260–273
- Fiorellini, J.P., Martuscelli, G. & Weber, H.P. (1998) Longitudinal studies of implant systems. *Periodontology 2000* **17**:125–131.
- Gerber, J., Wenaweser, D., Heitz-Mayfield, L., Lang, N.P. & Persson, G.R. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different methods. *Clinical Oral Implants Research* **17**:1-7.
- Gonçalves, L.F., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L.C., Teles, F.R., Mayer, M.P. & Faveri, M. (2012) Levels of *Selenomonas* species in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **47**: 711-718.
- Heuer, W., Kettenring, A., Stumpp, S.N., Eberhard, J., Gellermann, E., Winkel, A. & Stiesch, M. (2012) Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clinical Oral Investigations* **16**: 843-850.
- Heydenrijk, K., Meijer, H.J.A., van der Reijden, W.A., Raghoebar, G.M., Vissink, A. & Stegenga, B. Microbiota Around Root-Form Endosseous Implants: A Review of the Literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **17**: 829–838.
- Hultin, M., Gustafsson, A., Hallström, H., Johansson, L.Å., Ekfeldt, A. & Klinge, B. (2002) Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 349–358.
- Jepsen, S., Rühling, A., Jepsen, K., Ohlenbusch, B. & Albers, H.K. (1996) Progressive peri-implantitis. Incidence and prediction of peri-implant attachment loss. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 133-142.

- Koyanagi, T., Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Ohkuma, M. & Izumi, Y. (2010) Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *Journal of Oral Microbiology* **24**: 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5104.
- Kroes I, Lepp PW & Relman DA. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14547–14552.
- Kumar, P.S., Mason, M.R., Brooker, M.R. & O'Brien, K. (2012) Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *Journal of Clinical Periodontology* **39**: 425-433.
- Kumar, P.S., Griffen, A.L., Barton, J.A., Paster, B.J., Moeschberger, M.L. & Leys, E.J. (2003) New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of Dental Research* **82**: 338-344.
- Kumar, P.S., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L. & Leys, E.J. (2005) Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 3944-3955.
- Lee, K.H., Maiden, M.F.J., Tanner, A.C.R. & Weber, H.P. (1999) Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *Journal of Periodontology* **70**: 131-138
- Leonhardt, A., Dahlén, G. & Renvert, S. (2003) Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following Treatment of peri-implantitis in man. *Journal of Periodontology* **74**: 1415-1422.
- Leonhardt, A., Renvert, S. & Dahlén, G. (1999) Microbial findings at failing implants. *Clinical Oral Implants Research* **10**: 339-345.
- Li, L., Hsiao, W. W., Nandakumar, R., Barbuto, S. M., Mongodin, E. F., Paster, B. J., Fraser-Liggett, C. M. & Fouad, A. F. (2010) Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *Journal of Dental Research* **89**: 980–984.
- Lindhe, J. & Meyle, J., Group D of European Workshop on Periodontology. (2008) Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **35**: 282-285.
- Loesche, W.J. (1986) The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiology and Immunology* **1**: 65-72.
- López, N.J., Socransky, S.S., Da Silva, I., Japlit, M.R. & Haffajee, A.D. (2004) Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **75**:717-725.
- Maiden, M.F., Tanner, A. & Macuch, P.J. (1996) Rapid characterization of periodontal bacterial isolates by using fluorogenic substrate tests. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 376-384.

Máximo, M.B., Mendonça, A.C., Santos, V.R., Figueiredo, L.C., Feres, M. & Duarte, P.M. (2009) Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 99-108.

Mombelli, A. & Lang, N.P. (1998) The diagnosis and treatment of periimplantitis. *Periodontology 2000*. **17**: 63-76.

Mombelli, A., Müller, N. & Cionca, N. (2012) The epidemiology of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* **23**: 67-76.

Mombelli, A., van Oosten, M.A.C., Schurch, E. & Lang, N.P. (1987) The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiology and Immunology* **2**:145-151

Mombelli, A. (1999) Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang, N.P., Karring, T. & Lindhe, J., eds. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology, p. 281. Berlin: Quintessenz Verlag.

Mombelli, A. & Mericske-Stern, R. (1990) Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clinical Oral Implants Research* **1**: 1-7.

Mombelli, A. (1993) Microbiology of the dental implant. *Advances in Dental Research* **7**: 202-206.

Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F.E. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* **183**: 3770-3783.

Quirynen, M., Vogels, R., Peeters, W., van Steenberghe, D., Naert, I. & Haffajee, A. (2006) Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 25-37.

Renvert, S., Roos-Jansåker, A-M., Lindahl, C., Renvert, H. & Persson, G.R. (2007) Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 509-516.

Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E. & Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology* **11**: 94-100.

Riviere, G.R., Smith, K.S., Tzagaroulaki, E., Kay, S.L., Zhu, X., DeRouen, T.A. & Adams, D.F. (1996) Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *Journal of Periodontology* **67**: 109-15.

Sanz, M., Newman, M.G., Nachnani, S., Holt, R., Stewart, R. & Flemmig, T. (1990) Characterization of the subgingival microbial flora around endosteal sapphire dental implants in partially edentulous patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **5**: 247-53.

- Schlafer, S., Riep, B., Griffen, A.L., Petrich, A., Hübner, J., Berning, M., Friedmann, A., Göbel, U.B. & Moter, A. (2010) *Filifactor alocis*—involvement in periodontal biofilms. *BMC Microbiology* **10**: 66.
- Shchipkova, A.Y., Nagaraja, H.N. & Kumar, P.S. (2010) Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *Journal of Dental Research* **89**:1247-1253.
- Shibli, J.A., Melo, L., Ferrari, D.S., Figueiredo, L.C., Faveri, M. & Feres, M. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 975–982.
- Siqueira, J. F. Jr. & Rôcas, I. N. (2003) Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms or periradicular diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **18**: 263-265.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. & Kent Jr., R.L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**: 134-144.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Dzink, J.L. (1988) Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *Journal of Clinical Periodontology* **15**: 440-444.
- Socransky, S.S. & Haffajee, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* **38**:135-187.
- Tonetti, M.S. (1998) Risk factors for osseodisintegration. *Periodontology 2000* **17**: 55–62.

Table 1. Demographic characteristics and mean ($\pm SD$) full-mouth clinical parameters of the subjects in both groups.

| | Experimental groups | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|
| | Control | Test |
| Subjects (n) | 10 | 10 |
| Age (years) | 48.2 \pm 12.1 | 51.2 \pm 13.1 |
| Gender (M:F) | 5:5 | 6:4 |
| Probing depth (mm) | 2.0 \pm 0.9 | 2.6 \pm 0.9 |
| Clinical attachment level (mm)* | 0.8 \pm 0.3 | 2.5 \pm 1.5 |
| % sites with | | |
| Plaque | 22.1 \pm 5.2 | 34.2 \pm 9.1 |
| Gingival bleeding | 5.2 \pm 3.1 | 10.8 \pm 2.3 |
| Bleeding on probing | 7.7 \pm 1.2 | 12.8 \pm 4.2 |
| Suppuration | 0 \pm 0 | 0,03 \pm 0,02 |

The significance of differences between groups was assessed using Student's t-Test (* p<0.05)

Table 2. Mean (\pm SD) clinical parameters of the samples sites of subjects in both groups

| | Experimental groups | | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------|
| | Control | Test | |
| | Healthy implant | Healthy implant | Peri-implantitis |
| Probing depth (mm)* | 2.2 \pm 1.2 | 2.4 \pm 1.0 | 6.0 \pm 2.3* [#] |
| Clinical attachment level (mm)* | 0.8 \pm 0.8 | 1.0 \pm 0.6 | 5.8 \pm 3.0* [#] |
| % samples with | | | |
| Plaque | 20% | 20% | 90% |
| Gingival bleeding | 0% | 0% | 100% |
| Bleeding on probing | 0% | 0% | 100% |
| Suppuration | 0% | 0% | 50% |

The significance of differences between groups was assessed using Student's t-Test (* $p<0.05$ indicate significant differences between samples of the Test group with Control group). The significance of differences within subject in the Test group was assessed using paired Student's t-Test ([#] $p<0.05$ indicate significant differences within Healthy implant and Disease implant).

Table 3. Mean number (\pm standard deviation) of clones identified in each bacterial phyla in both groups

| Phylo | Experimental groups | | |
|-----------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|
| | Control | Test | |
| | Healthy implant | Healthy implant | Peri-implantitis |
| <i>Actinobacteria</i> | 8.60 \pm 4.79 | 8.40 \pm 4.38 | 2.70 \pm 2.16* [#] |
| <i>Bacteroidetes</i> | 5.90 \pm 3.48 | 6.50 \pm 5.28 | 10.50 \pm 3.95* |
| <i>Firmicutes</i> | 23.30 \pm 4.16 | 21.90 \pm 5.20 | 22.00 \pm 5.91 |
| <i>Fusobacteria</i> | 3.10 \pm 2.13 | 4.50 \pm 3.27 | 5.10 \pm 3.84 |
| <i>Proteobacteria</i> | 3.60 \pm 2.67 | 3.90 \pm 2.85 | 4.70 \pm 3.53 |
| <i>Spirochaetes</i> | 0.30 \pm 0.67 | 0.00 \pm 0.00 | 0.50 \pm 1.27 |
| <i>Synergistetes</i> | 0.80 \pm 0.92 | 0.40 \pm 0.70 | 0.20 \pm 0.63 |
| <i>TM7</i> | 0.00 \pm 0.00 | 0.10 \pm 0.32 | 0.70 \pm 1.06 |
| Total of clones | 45.60 \pm 2.32 | 46.70 \pm 3.47 | 46.40 \pm 2.99 |

The significance of differences between groups was assessed using Student's t-Test (* $p<0.05$ indicate significant differences between samples of the Test group with Control group). The significance of differences within subject in the Test group was assessed using paired Student's t-Test ([#] $p<0.05$ indicate significant differences within Healthy implant and Disease implant).

Table 4. Top-40 species/phylotypes in the Control and Test group.

| Species/phylotype | Experimental groups | | |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| | Control | Test | |
| | Healthy implant | Healthy implant | Peri-implantitis |
| <i>Prevotella oris</i> | 0.61 ± 0.35 | 0.91 ± 0.21* | 0.78 ± 0.47 |
| <i>Streptococcus mitis</i> | 0.86 ± 0.48 | 0.71 ± 0.64 | 0.29 ± 0.47* |
| <i>Veillonella parvula</i> | 0.49 ± 0.46 | 0.75 ± 0.46 | 0.50 ± 0.50 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 0.47 ± 0.44 | 0.48 ± 0.47 | 0.68 ± 0.56*# |
| <i>Capnocytophaga gingivalis</i> | 0.41 ± 0.39 | 0.50 ± 0.49 | 0.47 ± 0.43 |
| <i>Capnocytophaga granulosa</i> | 0.61 ± 0.54 | 0.29 ± 0.54 | 0.09 ± 0.29* |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | 0.25 ± 0.55 | 0.42 ± 0.55 | 0.26 ± 0.34 |
| <i>Parvimonas micra</i> | 0.38 ± 0.42 | 0.18 ± 0.29 | 0.47 ± 0.54* |
| <i>Streptococcus sanguis</i> | 0.34 ± 0.41 | 0.22 ± 0.49 | 0.36 ± 0.50 |
| <i>Prevotella intermedia</i> | 0.54 ± 0.61 | 0.00 ± 0.01* | 0.26 ± 0.45* |
| <i>Gemella haemolysans</i> | 0.17 ± 0.52 | 0.46 ± 0.52 | 0.11 ± 0.22* |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 0.42 ± 0.46 | 0.25 ± 0.34 | 0.36 ± 0.40 |
| <i>Actinomyces gerencseriae</i> | 0.16 ± 0.26 | 0.48 ± 0.54 | 0.25 ± 0.34 |
| <i>Capnocytophaga sputigena</i> | 0.48 ± 0.45 | 0.24 ± 0.41 | 0.16 ± 0.26 |
| <i>Campylobacter gracilis</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.31 ± 0.51 | 0.35 ± 0.52* |
| <i>Veillonella atypica</i> | 0.40 ± 0.37 | 0.30 ± 0.42 | 0.16 ± 0.35 |
| <i>Selenomonas sputigena</i> | 0.23 ± 0.37 | 0.21 ± 0.27 | 0.33 ± 0.54 |
| <i>Veillonella dispar</i> | 0.39 ± 0.42 | 0.38 ± 0.42 | 0.00 ± 0.00*# |
| <i>Dialister invisus</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.65 ± 0.42* |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | 0.15 ± 0.31 | 0.43 ± 0.38 | 0.16 ± 0.26 |
| <i>Actinomyces meyeri</i> | 0.29 ± 0.39 | 0.35 ± 0.41 | 0.00 ± 0.01* |
| <i>Granulicatella adiacens</i> | 0.43 ± 0.38 | 0.34 ± 0.30 | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Fusobacterium HOT 203</i> | 0.51 ± 0.39 | 0.07 ± 0.23 | 0.05 ± 0.17* |
| <i>Selenomonas dianae</i> | 0.35 ± 0.38 | 0.13 ± 0.27 | 0.23 ± 0.31 |
| <i>Selenomonas noxia</i> | 0.35 ± 0.38 | 0.10 ± 0.22 | 0.25 ± 0.33 |
| <i>Streptococcus HOT 073</i> | 0.23 ± 0.30 | 0.33 ± 0.47 | 0.07 ± 0.23* |
| <i>Shuttleworthia sattelles</i> | 0.34 ± 0.45 | 0.18 ± 0.38 | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Streptococcus HOT064</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 0.50 ± 0.48* |
| <i>Actinomyces israelii</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.56 ± 0.35 | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Actinomyces HOT 169</i> | 0.29 ± 0.31 | 0.28 ± 0.31 | 0.11 ± 0.23 |
| <i>Campylobacter showae</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.19 ± 0.33 | 0.26 ± 0.44 |
| <i>Catonella morbi</i> | 0.39 ± 0.42 | 0.00 ± 0.00 | 0.12 ± 0.27 |
| <i>Eubacterium infirmum</i> | 0.00 ± 0.00 | 0.22 ± 0.35 | 0.28 ± 0.41* |
| <i>Atopobium HOT 416</i> | 0.38 ± 0.43 | 0.07 ± 0.23 | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Neisseria oralis</i> | 0.17 ± 0.37 | 0.10 ± 0.22 | 0.29 ± 0.31 |
| <i>Prevotella melaninogenica</i> | 0.37 ± 0.49 | 0.00 ± 0.00* | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Filifactor alocis</i> | 0.10 ± 0.22 | 0.10 ± 0.22 | 0.21 ± 0.43* |
| <i>Actinomyces HOT 181</i> | 0.13 ± 0.27 | 0.20 ± 0.33 | 0.13 ± 0.27 |
| <i>Campylobacter curvus</i> | 0.35 ± 0.46 | 0.00 ± 0.01 | 0.00 ± 0.00* |
| <i>Mitsuokella HOT 131</i> | 0.05 ± 0.17 | 0.00 ± 0.00 | 0.29 ± 0.48* |

Data represent mean ± standard deviation; The significance of differences between groups was assessed using Student's t-Test (*p<0.05 indicate significant differences between samples of the Test group with Control group). The significance of differences within subject in the Test group was assessed using paired Student's t-Test (# p<0.05 indicate significant differences within Healthy implant and Disease implant).

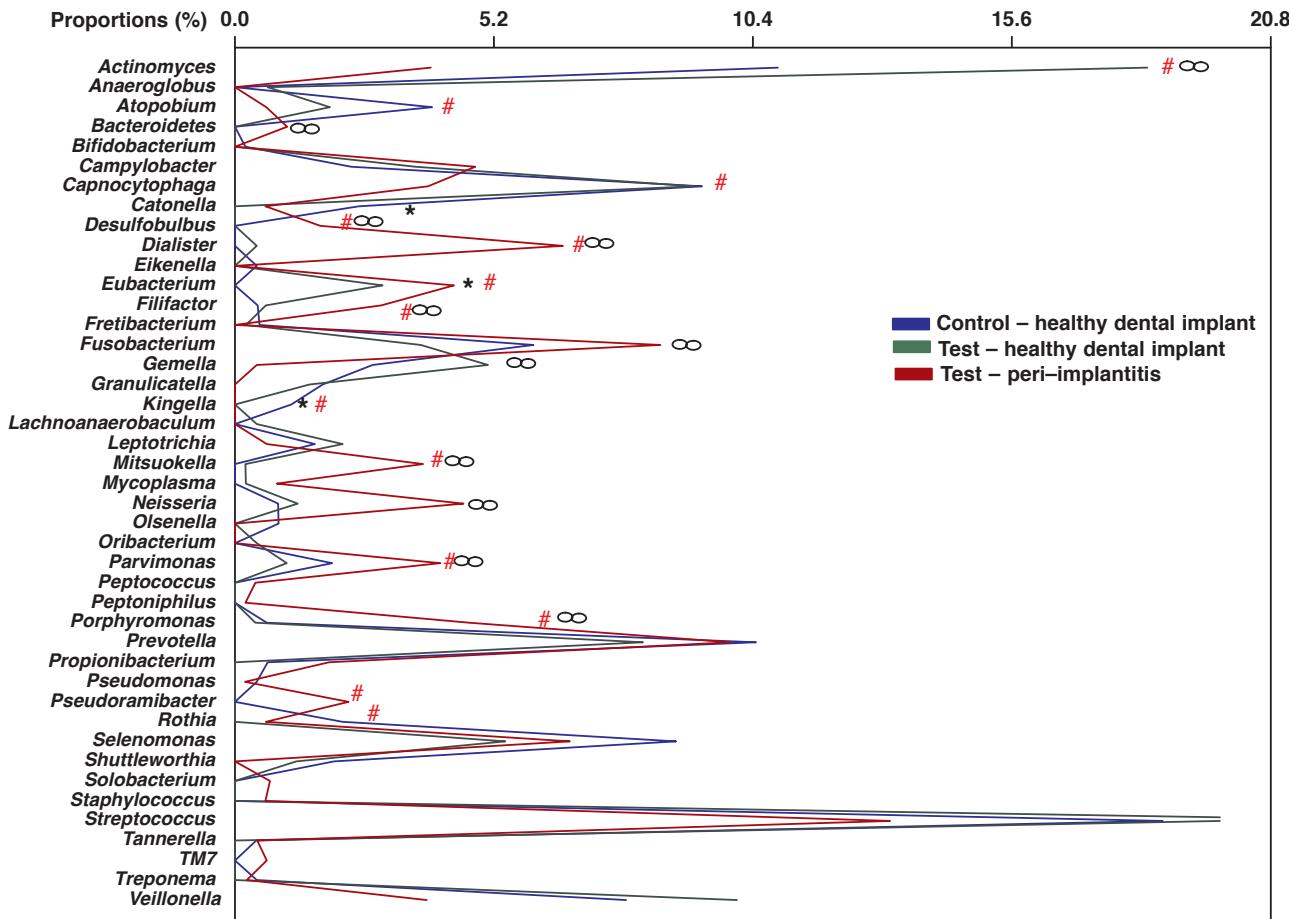


Figure 1. Mean proportions (percentage of total clones) of bacterial genus in peri-implant microbial diversity in healthy and disease. The significance of differences between groups was assessed using Student's t-Test ($*p<0.05$, indicate significant differences between healthy implants of the Test and Control groups, $\# p<0.05$, indicate significant differences between healthy implants of the Control group and disease implant of the Test group). The significance of differences within subject in the Test group was assessed using paired Student's t-Test ($^{\circ} p<0.05$, indicate significant differences within healthy implant and disease implant).

4 CONCLUSÃO

Foram observadas diferenças na composição do biofilme subgengival entre implantes saudáveis e doentes. A microbiota associada com a peri-implantite se mostrou preponderantemente composta por espécies bacterianas patogênicas do complexo laranja bem como por espécies “não-comuns” tais quais *Filifactor alocis*, *Dialister invisus* e *Mitsuokella* sp. HOT 131.

REFERÊNCIAS

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25 (4): 229-235.
2. Albrektsson T, Donos N. Implant survival and complications. The Third EAO consensus conference 2012. *Clin. Oral Implants Res.* 2012; 23(Suppl. 6): 63–65.
3. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV, In: Lang NP e Karring T (eds): Proceedings of th 1st European Workshop on Periodontology. London, Quintessence Publishing Co.; 1994. p.365.
4. Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol.* 1991;10(1):11-18.
5. Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol.* 1992; 63(6): 540-547.
6. An D, Dong X, Dong Z. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe.* 2005; 11(4): 207-215.
7. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993; 8(6): 609-615.
8. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1990; 5(1):31-38.
9. Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1987; 14(3):161-164.
10. Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3): 201-211.
11. Chuang SK, Tian L, Wei L, Dodson TB. Predicting dental implant survival by use of the marginal approach of the semi-parametric survival methods for clustered observations. *J Dent Res.* 2002; 81(12): 851-855.
12. Casarin RCV, Barbagallo A, Meulman BT, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodont Res.* 2012; doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x. [Epub ahead of print]
13. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk VDT, Dewhirst F, Paster BJ. Compararisons of subgingival

microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009; 80, 1421-32.

14. Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van Der VU. The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(11): 972-977.
15. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010; 192(19), 5002-5017.
16. Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Boches SK, Galvin JL, Paster BJ. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15(3):196-200.
17. Diaz PI, Dupuy AK, Abusleme L, Reese B, Obergfell C, Choquette L, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Terzi E, Strausbaugh LD. Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol*. 2012; 27(3): 182-201.
18. Eke PI, Braswell LD, Fritz ME. Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol*. 1998; 69(2):190-194.
19. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106(1):527–551.
20. Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Lekholm U. Histopathologic observations on early oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(6): 798-810.
21. Fardal O, Johannessen AC, Olsen I. Severe, rapidly progressing peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 1999; 26(5): 313-317.
22. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(9):739-749.
23. Faveri M, Gonçalves LF, Feres M, Figueiredo LC, Gouveia LA, Shibli JA, Mayer MP. Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri-implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. *J Periodontal Res*. 2011; 46(3):338-344.
24. Faveri M, Mayer MP, Feres M, Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol. Immunol*. 2008; 23(2):112-118.
25. Ferrigno N, Laureti M, Fanali S, Grippaudo, G. A long term follow up study of non submerged ITI implants in the treatment of totally edentulous jaws. Part I: Ten year life table analysis of prospective multicenter study with 1286 implants. *Clin Oral Implant Res*. 2002; 13(3):260-273.

26. Fiorellini JP, Martuscelli G, Weber HP. Longitudinal studies of implant systems. *Periodontol* 2000. 1998;17:125–131.
27. George K, Zafiropoulos GG, Murat Y, Hubertus S, Nisengard RJ. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J Periodontol*. 1994; 65(8): 766-770.
28. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 1990; 345(6270): 60-63.
29. Grassi S, Piattelli A, Ferrari DS, Figueiredo LC, Feres M, Iezzi G, Shibli JA. Histologic evaluation of human bone integration on machined and sandblasted acid-etched titanium surfaces in type IV bone. *J Oral Implantol*. 2007; 33(1): 8-12.
30. Heydenrijk K, Meijer HJA, van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissink A, Stegenga B. Microbiota Around Root-Form Endosseous Implants: A Review of the Literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. 2002; 17(6):829–838.
31. Hugenholtz P; Goebel BM; Pace NR . Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol*. 1998; 180(18): 4765-4774.
32. Hugenholtz P; Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends. Biotechnol* 1996; 14(6): 190-197.
33. Hughes JB, Hellmann JJ, Rickets TH, Bohannan JM. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental*. 2001; 67(10):4399-4406.
34. Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LÅ, Ekefeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis *Clin. Oral Impl. Res.* 2002; 13(4): 349–358.
35. Hunter-Cevera JC. The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Jun; 1(3):278-85.
36. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, Watson RM, Herrmann I. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Bränemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(1): 33-42.
37. Isidor F. Histological evaluation of peri-implant bone at implants subjected to occlusal overload or plaque accumulation. *Clin Oral Impl Res*. 1997; 8(1): 1-9
38. Isidor F. Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys. *Clin Oral Implants Res*. 1996; 7(2): 143-52.

39. Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991; 62(1): 2-4.
40. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*, Academic Press, 1969; Inc 3, 21-132.
41. Jung RE, Zembic A, Pjetursson BE, Zwahlen M, Thoma DS. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical and esthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(Suppl. 6): 2-21.
42. Kazor CE, Mitchell AM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2): 558-563.
43. Klinge B, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. *Dent Clin North Am.* 2005; 49(3): 661-676.
44. Klinge B, Meyle J. EAO Consensus Report: Peri-implant tissue destruction. The Third EAO Consensus Conference 2012. *Clin. Oral Impl. Res.* 2012; 23 (Suppl. 6): 108-110.
45. Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol.* 2010 May 24;2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5104.
46. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82(5): 338-44.
47. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3944-3955.
48. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(5):425-33.
49. Lang NP, Berglundh T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81.
50. Lee KH, Maiden MFJ, Tanner ACR, Weber HP. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol.* 1999; 70(2):131-8
51. Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlén G. Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagles dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3(3): 112-119.

52. Leonhardt A, Dahlén G, Renvert S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following Treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol.* 2003; 74(10): 1415-1422.
53. Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Impl Res.* 1999; 10(5): 339-345.
54. Lie MA, Danser MM, Van Der Weijden GA, Timmerman MP, De Graaf J, Van Der Velden U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(8): 642-647.
55. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999; 70(4):431–437.
56. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol.* 1985 Aug;56(8):447-56.
57. Máximo MB, Mendonça AC, Santos VR, Figueiredo LC, Feres M, Duarte PM. Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clin Oral Impl Res.* 2009; 20(1):99-108.
58. Melo L, Vitussi TRC, Andrade JA, Walter KG, Ferrari DS, Shibli JA. Microbiology of peri-implant diseases: literature review. *Rev Odontol UNESP.* 2007; 36(1):61-9.
59. Mombelli A, Feloutzis A, Brägger U, Lang NP. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline: clinical, microbiological and radiological results. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(4):287-94.
60. Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. *Periodontol 2000.* 1994; 4: 81-86.
61. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of perimplantitis. *Periodontol 2000.* 1998; 17:63–76.
62. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin. Oral Implants Res.* 23(Suppl. 6), 2012, 67–76
63. Mombelli A, Van Oosten MAC, Schurch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* 1987; 2(4):145-151
64. Mombelli A. Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J, editors. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology.* Berlin: Quintessenz Verlag; 1999. p. 281-303.
65. Nociti Jr FH, Toledo RC, Machado MAN, Stefani CM, Line SRP, Gonçalves RB. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2001; 12(4): 295-300.

66. Omar AA, Bullman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. *J Clin Periodontol.* 1999; 17(6): 364-370.
67. 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(4): 405-409.
68. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12): 3770-3783.
69. Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogeny of campylobacters, wolinellas, *Bacteroides gracilis*, and *Bacteroides ureolyticus* by 16S rRNA sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988; 38, p.56-62, 1988.
70. 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; 17(4): 386-393.
71. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res.* 1994; 5(4):254-259.
72. Quirynen M, Abarca M, Van Assche N, Nevins M, van Steenberghe D. Impact of supportive periodontal therapy and implant surface roughness on implant outcome in patients with a history of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(9): 805-815.
73. Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risk for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13(1): 1-19.
74. Quirynen M, Listgarten MA. Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res* 1990; 1(1): 8-12.
75. Quirynen M, Naert I, van Steenberghe D, Dekeyser C, Callens A. Periodontal aspects of osseointegrated fixtures supporting a partial bridge. An up to 6-year retrospective study. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(2): 118-126.
76. Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *Oral Implantol.* 1983; 11(1):93-100.
77. Rams TE, Roberts TW, Feik D, Molzan AK, Slots J. Clinical and microbiological findings on newly inserted hydroxyapatite-coated and pure titanium human dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991; 2(3):121-127.
78. Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent.* 1984b; 51(4):529-534.

79. Rams TE. Susceptibility of spirochetes and motile rods colonizing human dental implants to inorganic salts: therapeutic implications. *J Oral Implantol.* 1984a;11(3):341-7.
80. Renvert S, Roos-Jansåker 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(4):509-516.
81. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991; 2(3): 135-44.
82. Sakamoto M, Suzuki N, Okamoto M. *Prevotella aurantiaca* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60(Pt 3): 500-3.
83. Sakka S, Coulthard P. Implant failure: etiology and complications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(1):e42-44.
84. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, Smith FW, Collins JG, Socransky SS, et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(1):32-42.
85. Sanz M, Winkelhoff AJV. Periodontal infections: understanding the complexity Consensus of the seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* 2011; 38(Suppl 11): 3-6.
86. Schou S, Holmstrup P, Hjørting-Hansen E, Lang NP. Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3(4): 149-161.
87. Schou S, Holmstrup P, Keiding N, Fiehn NE. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3):190-200.
88. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89(11): 1247-53.
89. Shibli JA, Marcantonio E, d'Avila S, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Analysis of failed commercially pure titanium dental implants: a scanning electron microscopy and energy-dispersive spectrometer x-ray study. *J Periodontol.* 2005; 76(7): 1092-1099.
90. Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Jr. E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18(3):383 90
91. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 2008; 19(10):975–982

92. Siggins A, Enright AM, Abram F, Botting C, O'Flaherty V. Impact of trichloroethylene exposure on the microbial diversity and protein expression in anaerobic granular biomass at 37°C and 15°C. *Archaea*. 2012; 2012:940159. doi: 10.1155/2012/940159.
93. Silverstein LH, Kurtzman D, Garnick JJ, Schuster GS, Steflik DE, Moskowitz ME. The microbiota of the peri-implant region in health and disease. *Implant Dent*. 1994; 3(3):170-174.
94. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2):134-44.
95. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38:135-87.
96. Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants. Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009;11(1): 24-36.
97. van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Impl Res*. 2002; 13(6):617-622.
98. Van Winkelhoff AJ, Goene R, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(6):511–520.
99. Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl. 11): 7–16.
100. Whittaker RH. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 1969; 163(3863): 150-160.
101. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(12): 4576-4579.
102. Zhu WY, Williams BA, Konstantinov SR, Tamminga S, De Vos WM, Akkermans AD. Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during in vitro fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculum. *Anaerobe*. 2003; 9(4): 175-80.
103. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 286–291.