



Universidad
Complutense
Madrid

Periimplantitis inducida por ligaduras en perros Beagle. Resultados

microbiológicos.

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)

Facultad de Odontología.

Universidad Complutense de Madrid.

Realizado Por:

Adolfo Pereira Fernández.

Tutor:

Dra. Elena Figuero Ruiz

Introducción

El uso de implantes dentales es una modalidad de tratamiento muy utilizada en la actualidad, en gran parte debido al alto porcentaje de éxito que proporciona. Wennstrom et al. (2005) observa una tasa de éxito de más del 97% transcurridos 5 años desde la colocación del implante y su posterior restauración, siguiendo los criterios establecidos por Albrektsson e Isidor para determinar el éxito de un sistema de implantes, entre los cuales incluyen un promedio de pérdida ósea a nivel marginal, de menos de 1.5 mm durante el primer año tras la rehabilitación protésica y un máximo de 2.3 mm de pérdida ósea tras 5 años (Albrektsson et al. 1986).

Sin embargo, la terapéutica implantológica no es ajena a complicaciones, entre las que se encuentran aquellas relacionadas con hemorragia en el procedimiento quirúrgico, afectación a nivel sensorial en la zona tratada, fracturas óseas, desplazamiento del dispositivo implantario hacia los senos. Todas ellas forman parte de las más comunes a las que se hace referencia en la literatura actual (Goodacre et al. 2003).

Diferencias entre dientes e implantes

Los tejidos blandos que circundan dientes naturales y la mucosa de los implantes comparten características pero difieren en lo que se refiere a la composición del

tejido conjuntivo, sobre todo en la alineación y distribución de las fibras colágenas y el paquete vascular en la zona apical de la barrera epitelial.

Estudios utilizando modelos animales con perros, han servido a manera de maquetas para observar el comportamiento y funciones de los tejidos en dientes e implantes y así determinar las diferencias existentes entre ambos (Berglundh et al. 1991; Lang et al. 1999):

1. La organización de las fibras principales, que se extendían desde el cemento radicular en forma de abanico hasta los tejidos blandos y el periodonto marginal (Imagen 1.1) . En el caso del tejido alrededor de implantes, observan que las fibras colágenas del conjuntivo se originaban en el periostio de la cresta ósea y se extendían paralelas al implante, hasta llegar al margen del tejido blando (Berglundh et al. 1991; Jan Lindhe 2007).

2. Existe en estos estudios una observación importante de que la barrera epitelial de la mucosa sana terminaba a 1-5 mm del hueso (Imagen 1) (Jan Lindhe 2007) . En casos de infección alrededor de dientes (periodontitis) se observa un proceso autolimitado, en el que una cápsula de tejido conectivo separa el infiltrado inflamatorio del hueso. Mientras que en los implantes se observa una extensión de este infiltrado hacia la cresta ósea {Berglundh:2011kb}.

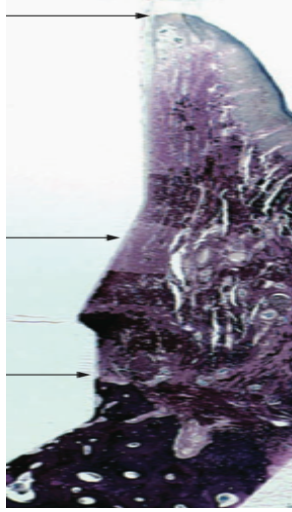


Imagen 1 - Corte vestibulo lingual de la mucosa periimplantaria, en el que se pueden observar la distribución de las células apicales del epitelio de unión (flecha central) y la cresta del hueso (flecha inferior) [JanLindhe:2007we]

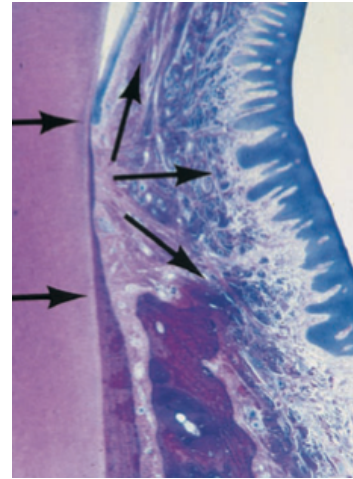


Imagen 1.1 - Imagen que muestra la dirección de las fibras, correspondientes a un premolar inferior [JanLindhe:2007we] .

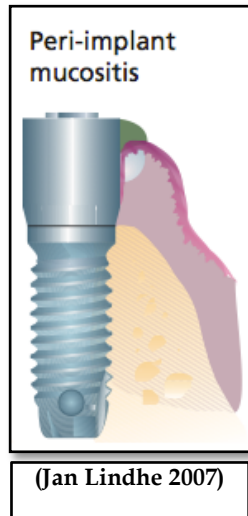
3. Finalmente una de las diferencias más importantes entre dientes e implantes, es la presencia del ligamento periodontal, que no existe en implantes. Este ligamento periodontal se encuentra ubicado en el espacio entre las raíces de los dientes y el hueso alveolar y se encuentra rodeando el diente hasta aproximadamente 1 mm de la unión cemento adamantina (Jan Lindhe 2007). Entre las funciones del ligamento periodontal encontramos la función de unión del diente al hueso del alveolo, la capacidad de sus fibras para la absorción de fuerzas provenientes de la masticación, la función sensitiva y por último la capacidad de las células del ligamento periodontal en la regeneración del ligamento periodontal (Amin et al. 2013; Zhang et al. 2012; Zhao et al. 2013; Isaka et al. 2001).

4. Debido a ello la unión entre el implante y el hueso se establece mediante lo que algunos autores definieron como “Anquilosis funcional” (Schroeder et al. 1976). En dicha publicación los autores describen la fijación del implante en el hueso maxilar y afirman que el hueso nuevo se deposita directamente sobre la superficie implantaria siempre y cuando se cumplan todas las reglas para la instalación de los mismos (Jan Lindhe 2007).

Enfermedades periimplantarias

Las enfermedades periimplantarias están conformadas por un grupo de entidades que se desarrollan en los tejidos que circundan los implantes y que son el resultado de un desequilibrio entre la carga bacteriana y el sistema de defensa del huésped (Heitz-Mayfield 2008), (Zitzmann & Berglundh 2008). Puede afectar solo la parte correspondiente a los tejidos blandos (mucositis periimplantaria), o al tejido óseo (periimplantitis) (Lindhe, MeyleGroup D of European Workshop on Periodontology 2008a).

I. Mucositis periimplantaria

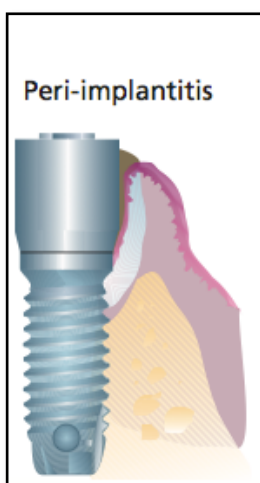


El término mucositis periimplantaria se refiere a una lesión reversible de tipo inflamatorio que se limita a la mucosa, cuyo parámetro clave para el diagnóstico corresponde al sangrado al sondaje suave ($<0.25\text{N}$) (Lang et al. 2011). Representa la respuesta de los tejidos blandos periimplantarios ante un desafío bacteriano que no difiere de la respuesta existente en la gingivitis. Aun existiendo diferencias de desarrollo en el epitelio de unión entre

dientes e implantes, no existen evidencias a nivel estructural o funcional y se considera que el sellado epitelial alrededor de los dientes y de los implantes es idéntico (Lang et al. 2011). Desde el punto de vista clínico los signos que la caracterizan incluyen, sangrado y/o supuración al sondaje, pero siempre sin que exista evidencia radiográfica de pérdida ósea (Fransson et al. 2005; Anon 2013) (Roos-Jansåker, Lindahl, et al. 2006a). En estudios con 9 a 14 años de seguimiento se ha determinado que la mucositis periimplantaria está presente en 48% de implantes (Roos-Jansåker, Renvert, et al. 2006b). La información en torno a estudios longitudinales en pacientes tratados con implantes es escasa en cuanto a valores de prevalencia se refiere, solo dos estudios con muestras de 662 pacientes/3413 implantes (Fransson et al. 2005) y 216 pacientes/987 implantes

(Roos-Jansåker, Lindahl, et al. 2006a; Renvert et al. 2007) fueron incluidos en una revisión realizada por Zitzman y Berglundh (2008) (Zitzmann & Berglundh 2008). En dicha revisión la incidencia de mucositis periimplantaria era del 80% de los sujetos y en un 50% de las localizaciones con implantes. Aun presentando un porcentaje alto en cuanto a su prevalencia, se considera que es una condición reversible siempre y cuando se detecte a tiempo y remueva el factor etiológico.

II. Periimplantitis



(Jan Lindhe 2007)

La periimplantitis fue definida en el 6º Workshop Europeo de periodoncia, como una lesión de tipo inflamatorio que se encuentra afectando tanto los tejidos blandos que rodean al implante, como también el tejido óseo de soporte en implantes con función. Junto con la mucositis periimplantaria conforman dos entidades de etiología bacteriana (Lindhe, Meyleon behalf of Group D of the European Workshop on

Periodontology 2008b).

Las periimplantitis está caracterizada por cambios a nivel de la cresta ósea, sumado a la presencia de sangrado al sondaje independientemente de la

profundidad que presenten las bolsas. Esta lesión puede ser iniciada por factores como restauraciones sobrecontorneadas, mal adaptadas o mala posición del implante.(Lang et al. 2011).

La periimplantitis en fase más temprana se presenta en la porción más coronal del implante, mientras a nivel apical se muestra el implante oseointegrado, manteniendo la estabilidad del mismo (Lindhe et al. 1992). El análisis radiográfico que muestre pérdida de tejido óseo que rodea al implante (Imagen 3) (Gattani & Salman T 2011), sirve como marcador para determinar la presencia de periimplantitis

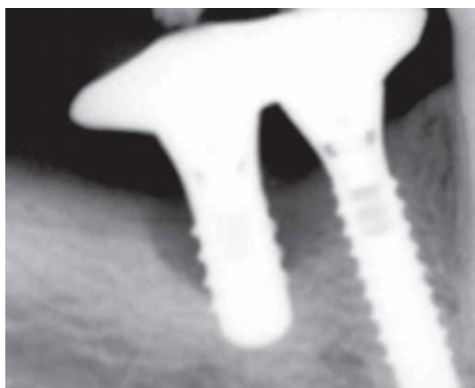


Imagen 3 - Radiografía que muestra la presencia de tejido óseo de soporte , clara muestra de periimplantitis

III. Características de la lesión periimplantaria

A través de estudios se ha comprobado que a pesar de las similitudes clínicas existentes entre periodontitis y periimplantitis, se pueden encontrar diferencias a nivel histológico entre ambas patologías. En resultados obtenidos en una extensa revisión realizada por el grupo de investigación de la universidad de Goteborg y la universidad de Basel (Berglundh, Zitzmann & Donati 2011a), se puede observar las diferencias existentes entre ambas entidades. Modelos experimentales de periimplantitis en contraste con modelos experimentales de periodontitis, muestran signos agudos de inflamación y acumulación de grandes cantidades de osteoclastos formando una capa sobre la superficie del hueso crestral en distintas etapas. Las lesiones fueron producidas mediante la inducción de la enfermedad periimplantaria utilizando ligaduras, que facilitan la acumulación de placa y finalmente se llega a la pérdida ósea tras de la eliminación de las ligaduras. En ellos se observa una extensión apical inflamatoria, más pronunciada en los casos de lesiones periimplantarias que en los casos de periodontitis.

La lesión periimplantaria se extiende apicalmente al epitelio de la bolsa y la porción más apical de esta lesión se encuentra en contacto directo con el biofilm bacteriano que reside en la superficie implantaria, a diferencia de la periodontitis

en la cual podremos observar un proceso autolimitado en el cual una cápsula de tejido conectivo va a separar la lesión del tejido óseo (Lang et al. 2011).

Lesión periimplantaria frente a lesión periodontal

Pese a las similitudes referentes a las características clínicas y a la etiología de periodontitis y periimplantitis, se encuentran diferencias histopatológicas esenciales entre ambas entidades (Berglundh, Zitzmann & Donati 2011b). Utilizando material de biopsia fueron evaluadas las características en la respuesta de los tejidos en ambos casos. Obteniendo resultados en los que se ve una extensión del infiltrado inflamatorio superior en los casos de periimplantitis comparadas con las muestras correspondientes a periodontitis y localizada en la mayoría de los casos apicalmente en relación con el epitelio de la bolsa. Mientras que en estudios experimentales correspondientes a la misma publicación, los autores observan la pérdida de tejido de soporte, como consecuencia de la acumulación de placa y presencia de un gran infiltrado inflamatorio alrededor de dientes e implantes (Berglundh, Zitzmann & Donati 2011b).

Queda determinado por la evidencia obtenida en los estudios analizados por el grupo de T. Berglundh (Berglundh, Zitzmann & Donati 2011b) que existe un proceso autolimitado en los tejidos que circundan los dientes naturales, con la presencia de una cápsula de tejido conectivo que separa al hueso del infiltrado

inflamatorio, mientras que en los casos de implantes el proceso inflamatorio se extiende con libertad hacia la cresta ósea.

IV. Etiología de las enfermedades periimplantarias

La relación entre la acumulación de placa y las enfermedades periodontales ha quedado bien establecida (Mombelli, Nyman, et al. 1995a; Friskopp & Hammarström 1980; Jan Lindhe 2007).

Algunos estudios han servido para comparar y comprobar las similitudes existentes entre la biopelícula subgingival en dientes y la correspondiente a la superficie periimplantaria (Mombelli et al. 1988; Mombelli, Marxer, et al. 1995b)

En situaciones de salud periimplantaria, la microbiota se ve representada en un 80% por bacterias de tipo cocoide Gram positivas facultativos y en algunas localizaciones se encuentra un aumento en el número de filamentosas y un descenso en el grupo cocoide tras 21 días de la colocación de los implantes, al igual que la presencia de *Actinomyces*, *Fusobacterium*. En otros estudios también se asocian a bacterias como *Bacteroides* sp y Espiroquetas (Mombelli et al. 1988; Mombelli et al. 1987).

A través de varios estudios sobre periimplantitis se ha encontrado una microbiota similar a la relacionada con la enfermedad periodontal, principalmente conformada por miembros de los complejos rojo y naranja, entre los microorganismos implicados podremos encontrar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y espiroquetas (Heitz-Mayfield & Lang 2010; Shibli et al. 2008; Quirynen et al. 2002; Mombelli, Marxer, et al. 1995b).

Una vez mencionada la influencia del biofilm bacteriano como factor importante dentro de las enfermedades periimplantarias, vale la pena definir el biofilm bacteriano, lo cual ayudará a comprender el comportamiento y la función que desempeñan estas bacterias.

Donlan y Costerton (Donlan & Costerton 2002), definen el biofilm bacteriano como una comunidad bacteriana caracterizada por células que se unen irreversiblemente a un sustrato o la interfaz o el uno al otro, se encuentran embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que se han producido, y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de genes. Dentro del biofilm las bacterias se encuentran rodeadas por una matriz extracelular de producción propia, lo que representa un 90% de la masa total (Flemming & Wingender 2010). La matriz formada por polímeros extracelulares,

proteínas de unión, fibras adhesivas, y ADN extracelular, conforma una estructura tridimensional.

La microbiota asociada a tejidos periodontales es similar a la encontrada en tejidos periimplantarios, por lo cual factores como la localización, mal posición y otros factores que puedan provocar una limpieza inadecuada de la zona por parte del paciente, deben considerarse como factores coadyuvantes para el desarrollo de patologías periimplantarias.

V. Modelos de experimentación animal

Todos estos hallazgos han sido posibles en la investigación mediante el uso de modelos experimentales en animales que funcionan como un complemento a los experimentos *in vitro* (A. Bhardwaj & S. V. Bhardwaj 2012). Sobre estos modelos es posible realizar cortes histológicos, lo cual resulta una indiscutible ventaja para lograr observar la verdadera estructura y comportamiento de la lesión en los tejidos de soporte periimplantarios. Los modelos animales hacen posible la validación de hipótesis y la comprobación de la seguridad y eficacia de nuevos tratamientos (A. Bhardwaj & S. V. Bhardwaj 2012). En el campo microbiológico se ha logrado advertir las similitudes que existen en los principios básicos de la

formación de la biopelícula bacteriana alrededor de dientes e implantes. Sin embargo a través del análisis por estudios *in-vitro* e *in-vivo* en las superficies de los pilares, se ha podido comprobar que las diferencias existentes pueden ser debidas a las propiedades de las superficies entorno a las cuales se establece el biofilm (Lang et al. 2011).

VI. Modelo experimental en perros.

El modelo canino ha sido uno de los más utilizados en la investigación en el campo periodontal. Se ha establecido la necesidad de utilizar este tipo de modelo animal para el estudio de las enfermedades periodontales, permitiendo determinar la prevalencia y las características principales de sus estadios (Albuquerque et al. 2012). La enfermedad periodontal es una patología común entre los perros, presentando una alta prevalencia en torno a los 2 años de vida. Tanto los rasgos histológicos como los comportamientos fisiopatológicos en el humano y en el perro, resultan similares en casos de salud y enfermedad (Albuquerque et al. 2012). La inducción de la enfermedad periimplantaria se logra por medio de la colocación de ligaduras alrededor de las piezas en las que se quiere estudiar el desarrollo de la enfermedad, estas ligaduras se suelen mantener por periodos de 4-6 meses (Struillou et al. 2010).

Mediante modelos animales con perros se ha logrado determinar que la flora subgingival de dichos animales, muestra grandes similitudes con las bacterias presentes en los seres humanos a nivel de género y aunque difieran a nivel de especies mantendrían una estrecha relación genética (Dahlén et al. 2011).

Debido a la falta de estudios experimentales que aborden el campo de la microbiología, existe la necesidad de realizar un análisis del biofilm bacteriano relacionado con superficie de implantes afectados por periimplantitis antes y después de haber realizado el tratamiento, de manera tal que se pueda contrastar la composición del mismo con el comportamiento de los tejidos y las distintas fases de la inducción desarrollo y tratamiento de la enfermedad periimplantaria.

El objetivo de este estudio es relacionar la presencia y composición del biofilm bacteriano con las diferentes fases de la enfermedad (pre-tratamiento, fase de inducción y post-tratamiento), para así poder identificar qué miembros de la flora subgingival actúan sobre los tejidos en cada uno de los estadios de la enfermedad y posteriormente relacionar estos datos con los hallazgos clínicos e histológicos del comportamiento de los tejidos ante la invasión bacteriana

Hipótesis del estudio

A través de un modelo experimental es posible observar cambios en la composición de la microbiota subgingival, relacionados con estadios específicos de la enfermedad periimplantaria y de esta manera se podrá determinar qué microorganismos son responsables de los cambios en los tejidos y cuales ceden ante la fase de tratamiento quirúrgico.

Material y métodos

Consideraciones éticas.

El estudio ha sido aprobado por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela. Tanto procedimientos como cuidado y mantenimiento de los animales que son objeto de investigación, están a cargo del Hospital Universitario Veterinario Rof Codina, en la ciudad de Lugo.

Muestra

La muestra del estudio está conformada por ocho (8) perros de raza Beagle, a los cuales se les ha realizado cirugía para extraer de manera bilateral los premolares (PM2-PM4). Transcurridos tres meses de las extracciones se colocan tres (3) implantes (3.3 x 8 mm, Roxolid™, Straumann) en cada hemimandíbula, obteniendo así seis implantes por animal y un total de 48 implantes instalados. Desde el momento de la colocación de los implantes y hasta la colocación de la primera ligadura se realizó un protocolo de limpieza primero 15 días con un colutorio diario (Perio·Aid® CHX 0.12% + CPC 0.05%) y después limpieza con cepillo dental y gel bioadhesivo de clorhexidina (Perio·Aid®) tres veces por semana.

Tres meses después de la cirugía para colocación de implantes, se procede a la colocación de las ligaduras alrededor de los implantes (Seda 4 ceros). Estas ligaduras son substituidas con unas nuevas ligaduras dos veces más en intervalos de 1 mes, durante los 3 meses correspondientes a la etapa de inducción de la periimplantitis. Los animales son sometidos a una dieta blanda y se eliminan los cuidados para el control de placa desde el día de inicio de la inducción de la periimplantitis y se continúa en la fase de progresión. Tras retirar las ligaduras se espera 1 mes para permitir la cicatrización de los tejidos.

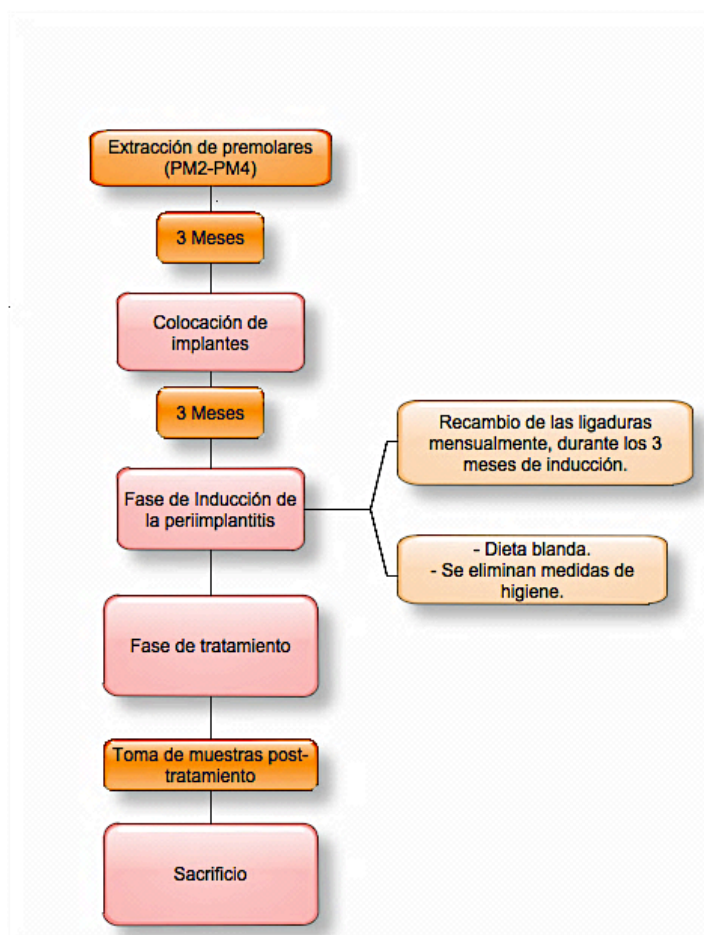


Diagrama 1 - Cronología de tratamiento.

A los animales les fue tratada la periimplantitis, utilizando un protocolo quirúrgico el cual consiste en el levantamiento de colgajos para acceder a la zona, el uso de clorhexidina, cloruro de sodio, sistema de ultrasonidos (con puntas de teflón) y cepillos de titanio para tratar la superficie implantaria.

A partir del día en el que se aplica tratamiento quirúrgico, se restablecen las medidas para el control de placa y se les administra un antibiótico intravenoso, Cefalozina 20mg/kg y Cefovecina 8 mg/Kg subcutánea. Estos antibióticos solo fueron administrados en las citas correspondientes a los procedimientos quirúrgicos (Extracción de dientes y colocación de implantes, Diagrama 1).

Toma de muestras microbiológicas

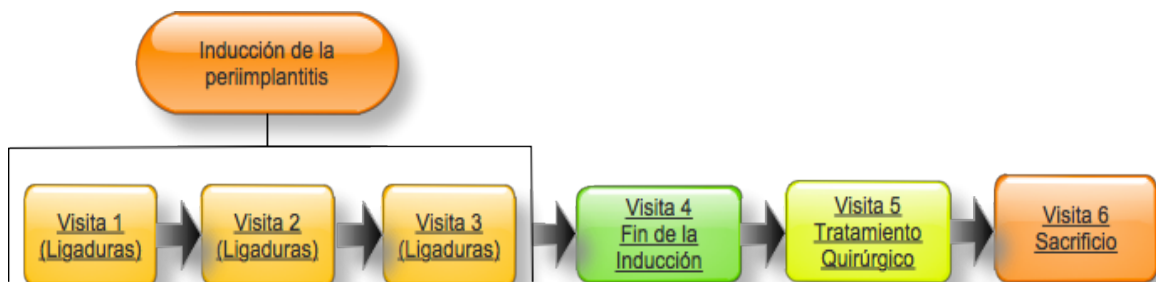


Diagrama 2 - Distribución de la toma de muestras.

La recogida de las muestras microbiológicas se realizó a partir del primer día de la inducción de la periimplantitis y posteriormente en cada visita (Diagrama 2).

Se limpia la superficie implantaria con una gasa y se introducen dos puntas de papel estériles (mesial y distal) en los implantes mesiales de cada hemimandíbula. Dichas muestras fueron repartidas en dos viales, correspondientes al lado derecho e izquierdo de cada perro.

El procedimiento se realiza siguiendo el mismo protocolo en cada uno de los perros que conforman la muestra. Las puntas de papel cargadas con la muestra se introdujeron en viales con RTF (Reduce Fluid Transport).

Tanto los procedimientos quirúrgicos como la toma de muestras microbiológicas, fueron realizadas bajo supervisión especializada en el Hospital Universitario veterinario Rof Codina (Lugo), perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España)

Procesado de las muestras microbiológicas

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio se procede a realizar la dispersión de estas utilizando un Vortex durante 30 segundos, esto se realiza con la finalidad de obtener homogeneidad en la muestra.

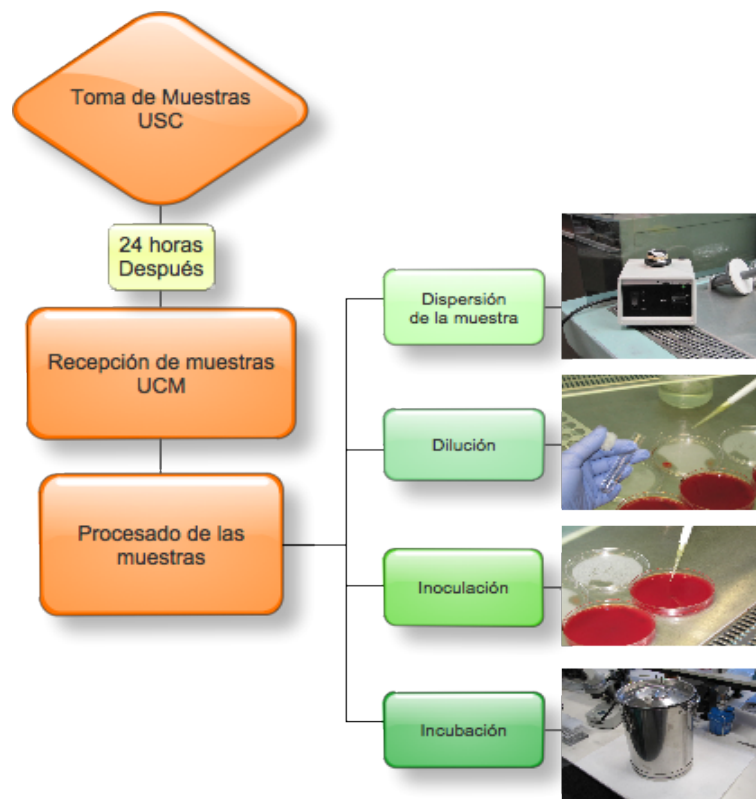


Diagrama 3 - Procesado de las muestras.

I. Dilución de las muestras.

Una vez homogeneizadas las muestras se realizaron diluciones seriadas en medio PBS (10^{-0} , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Para realizar las diluciones se tomaron 0.1 ml del vial y se dispersaron en un tubo con un contenido de 0.9 ml de PBS (10^{-1}), de este tubo se tomaron otros 0.1 ml de muestra y se añadió a otro tubo con 0.9 ml de PBS (10^{-2}). Este proceso se repite hasta llegar a la última dilución (10^{-4}).

II. Inoculación.

Se toman 0.1 ml de cada una de las diluciones y se procedió a su plaqueo (diluciones 1, 2, 3, 4) en placas preparadas con medio Agar - Sangre (5% Sangre de caballo, 5% de solución hemina - menadiona) y se distribuye homogéneamente la muestra en la placa de Petri utilizando un asa de vidrio previamente esterilizada.

Se preparó un medio específico para el cultivo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Medio Dentaid-10), utilizando BHI a la que se le agrega 5g de extracto de levadura, 1.5 g de fumarato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y 1 g de formiato de sodio (Sigma) por cada litro. El medio se trata en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C. El pH

final era de 7.2 ± 0.2 . Una vez que el medio se enfría a 50°C . La vancomicina se añade a una concentración final de $9\ \mu\text{g}/\text{ml}$.

III. Incubación.

Las placas se incuban en una estufa a 37°C , durante 7 días ($80\% \text{N}_2$, $10\% \text{H}_2$, 10% de CO_2). Algunas especies de crecimiento más lento requieren otros 7 días de incubación, un ejemplo de estas es *Porphyromonas gingivalis*. Transcurridos 7 días de incubación en medio Agar - Sangre es posible detectar los siguientes patógenos: *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytopaga sp.*

Una vez transcurridos 14 días desde la inoculación, se procede a realizar la identificación y el recuento de las colonias.

IV. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de este estudio se han utilizado los valores correspondientes al total de Unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de las especies microbiológicas (valores expresados en UFC/ ml) : *Porphyromonas*

gingivalis, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* y el total de UFC correspondiente a las especies anaerobias. Se calculó el porcentaje de cada patógeno respecto al recuento total de especies anaerobias de cada muestra y la prevalencia de cada bacteria, correspondiente al porcentaje de muestras positivas respecto al total de las muestras.

Se empleó como unidad de análisis la localización.

Para las variables cuantitativas, se utilizó análisis de la variancia (ANOVA) con la comparaciones múltiples post-hoc con la corrección de Bonferroni. Para el análisis de valores correspondientes a las prevalencias se aplicó la prueba de Chi-cuadrado. Todas las pruebas estadísticas correspondientes a la muestra fueron realizadas utilizando software computarizado (IBM-Spss). Se establece un límite para significación estadística de $p= 0.05$ en todas las pruebas.

Resultados

Descripción de la muestra

Fueron analizadas las muestras provenientes de un total de 8 perros (n=16 muestras por visita).

Fueron excluidas muestras en la tercera visita, correspondiente a la fase de inducción, debido a un fallo en la anaerobiosis, lo cual produjo un fallo en el crecimiento de las mismas.

En la última etapa del tratamiento, antes del sacrificio se produjo un drop-out correspondiente a uno de los animales (perro #3) que falleció a consecuencia de una pelea en el animalario. Se conservó en formol la mandíbula de este sujeto, para posteriormente realizar cortes histológicos.

Total de bacterias anaerobias.

En la tabla 1 se observan los totales de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) por especies y en conjunto. No se observan diferencias significativas entre las fases de inducción, tratamiento y post-tratamiento.

Especies Anaerobias	Bacterias Anaerobias (UFC/ml) / Desviación estándar (DS)					
	Etapas del tratamiento					
	Ligaduras (V1)	Ligaduras (V2)	Ligaduras (V3)	Fin de inducción (V4)	Tratamiento Quirúrgico (V5)	Sacrificio (V6)
<i>P. gingivalis</i>	2,96 x 10 ⁵ (4,82 x 10 ⁵)	8,35 x 10 ⁵ (1,37 x 10 ⁶)	4,29 x 10 ⁵ (3,07 x 10 ⁵)	8,95 x 10 ⁵ (8,48 x 10 ⁵)	4,75 x 10 ⁵ (3,67 x 10 ⁵)	9,02 x 10 ⁵ (1,00 x 10 ⁶)
<i>P. intermedia</i>	2,58 x 10 ⁵ (3,26 x 10 ⁵)	1,25 x 10 ⁵ (1,91 x 10 ⁵)	1,63 x 10 ⁵ (2,59 x 10 ⁵)	8,04 x 10 ⁴ (7,35 x 10 ⁴)	2,87 x 10 ⁵ (3,35 x 10 ⁵)	1,13 x 10 ⁵ (2,00 x 10 ⁵)
<i>P. micros</i>	-	8,16 x 10 ⁴ (1,66 x 10 ⁵)	1,02 x 10 ⁵ (2,02 x 10 ⁵)	1,77 x 10 ⁴ (5,05 x 10 ⁴)	1,93 x 10 ⁴ (4,54 x 10 ⁴)	-
<i>T. forsythia</i>	1,61 x 10 ⁴ (2,38 x 10 ⁴)	7,26 x 10 ⁴ (1,31 x 10 ⁵)	1,71 x 10 ⁴ (2,78 x 10 ⁴)	4,04 x 10 ⁴ (9,21 x 10 ⁴)	3,08 x 10 ⁴ (6,30 x 10 ⁴)	4,13 x 10 ⁴ (3,64 x 10 ⁴)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	-	-	-
Total Anaerobios	3,23 x 10⁶ (6,34 x 10⁶)	4,58 x 10⁶ (3,78 x 10⁶)	2,06 x 10⁶ (1,30 x 10⁶)	4,75 x 10⁶ (2,52 x 10⁶)	3,69 x 10⁶ (2,84 x 10⁶)	2,17 x 10⁶ (1,98 x 10⁶)

Tabla 1 - recuentos bacterianos totales expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) y Desviaciones estándar (DS)

Porcentaje de cada patógeno.

Tal como se puede observar en la tabla 2, los patógenos estudiados siguen un patrón similar entre las visitas de las diferentes etapas del tratamiento, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas. Presentan aumento al final del tratamiento *P.gingivalis* y *T. forsythia*, mientras que hay una desaparición de *P. micros* y una disminución en el porcentaje de aproximadamente un 3% en *P. intermedia*.

Especies Anaerobias	Porcentaje (%) / Desviación estándar (DS)					
	Visitas					
	Ligaduras (V1)	Ligaduras (V2)	Ligaduras (V3)	Fin de inducción (V4)	Tratamiento Quirúrgico (V5)	Sacrificio (V6)
<i>P. gingivalis</i>	23,67 (40,92)	15,83 (12,14)	23,06 (12,87)	21,45 (16,29)	14,18 (9,47)	37,21 (18,09)
<i>P. intermedia</i>	16,92 (42,46)	2,51 (3,67)	5,85 (7,73)	1,99 (2,53)	7,63 (5,92)	4,03 (3,95)
<i>P. micros</i>	-	2 (3,9)	4 (5,5)	-	1 (1,6)	-
<i>T. forsythia</i>	1 (3,4)	1 (1,8)	1 (0,8)	1 (1,9)	1 (1,4)	4 (6,2)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	-	-	-

Tabla 2 - Porcentaje de patógenos periodontales.

Existe una constante de dispersión en la distribución de los microorganismos dentro de cada una de las muestras, esto es evidente si observamos los diagramas de cajas de cada una de las especies (Diagrama 1,2,3,4). Salvo en algunas muestras muy puntuales en las q vemos una distribución normal, una de ellas es la muestra de *P.gingivalis* correspondiente al sacrificio y fin de la inducción de la periimplantitis (Diagrama 1), caso que se repite para *P. intermedia* en la etapa de tratamiento (Diagrama 2).

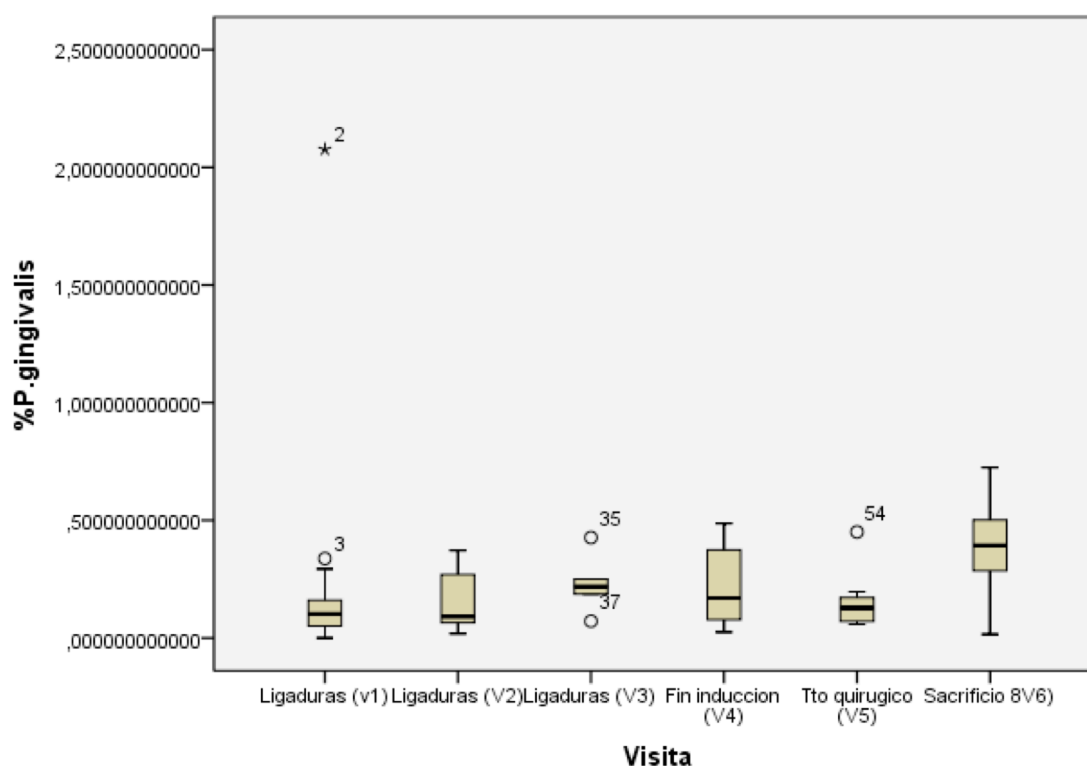


Diagrama 4 - Porcentajes de *P. gingivalis*

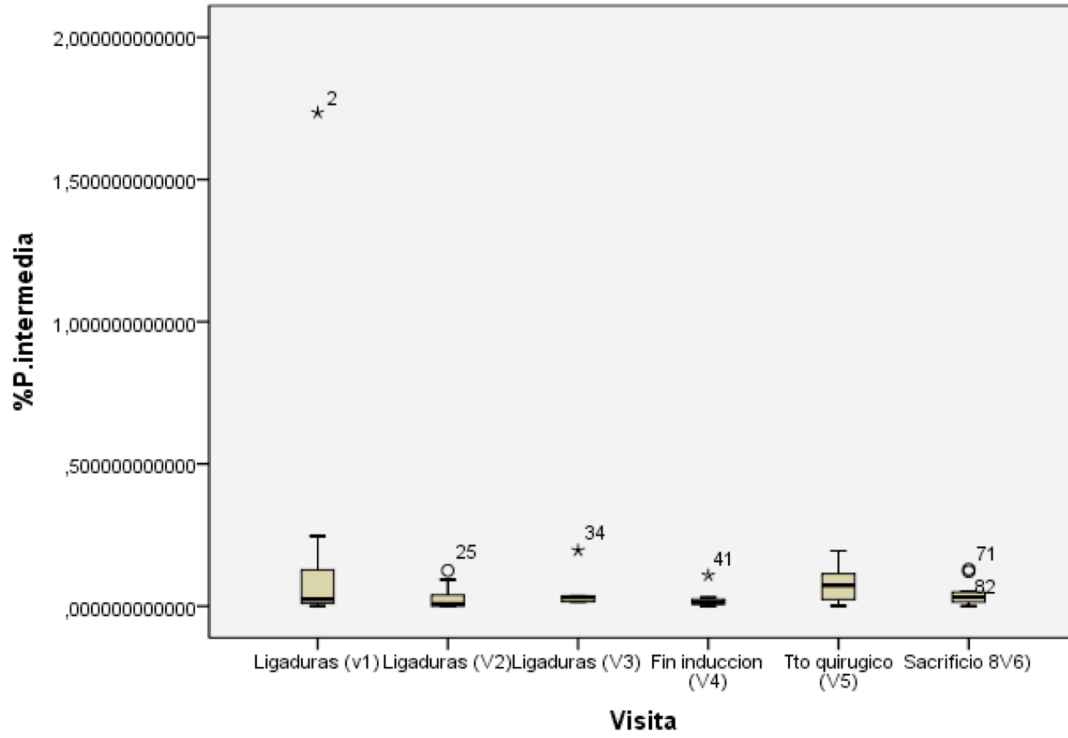


Diagrama 5 - Porcentajes *P. intermedia*

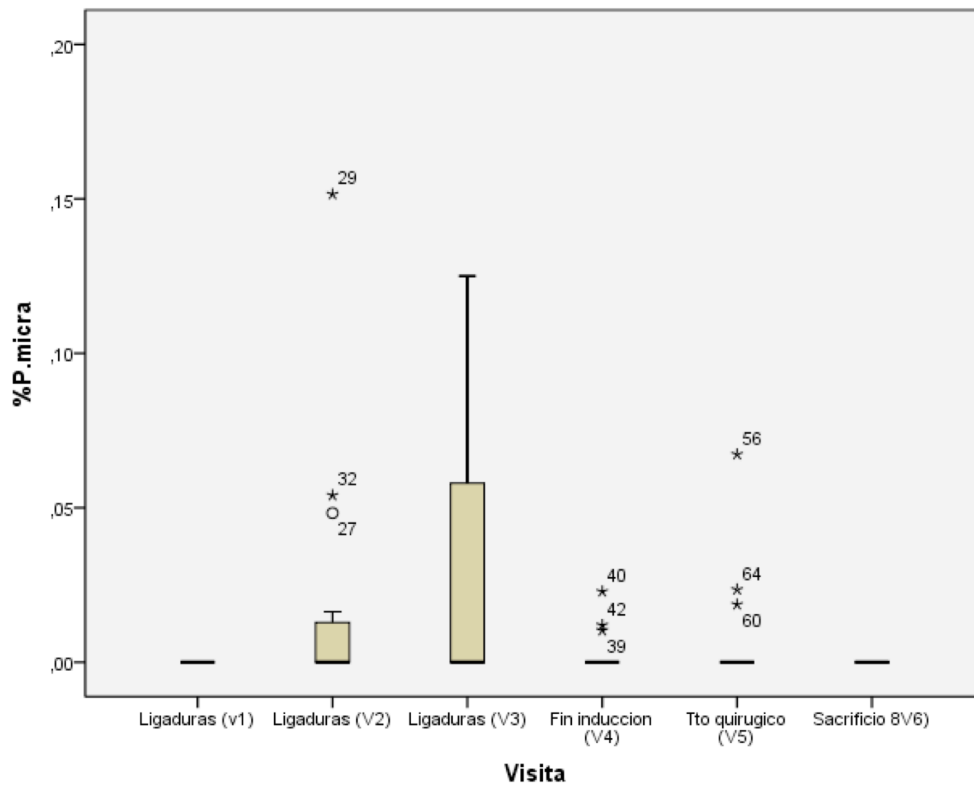


Diagrama 6 - Porcentaje *P. micra*

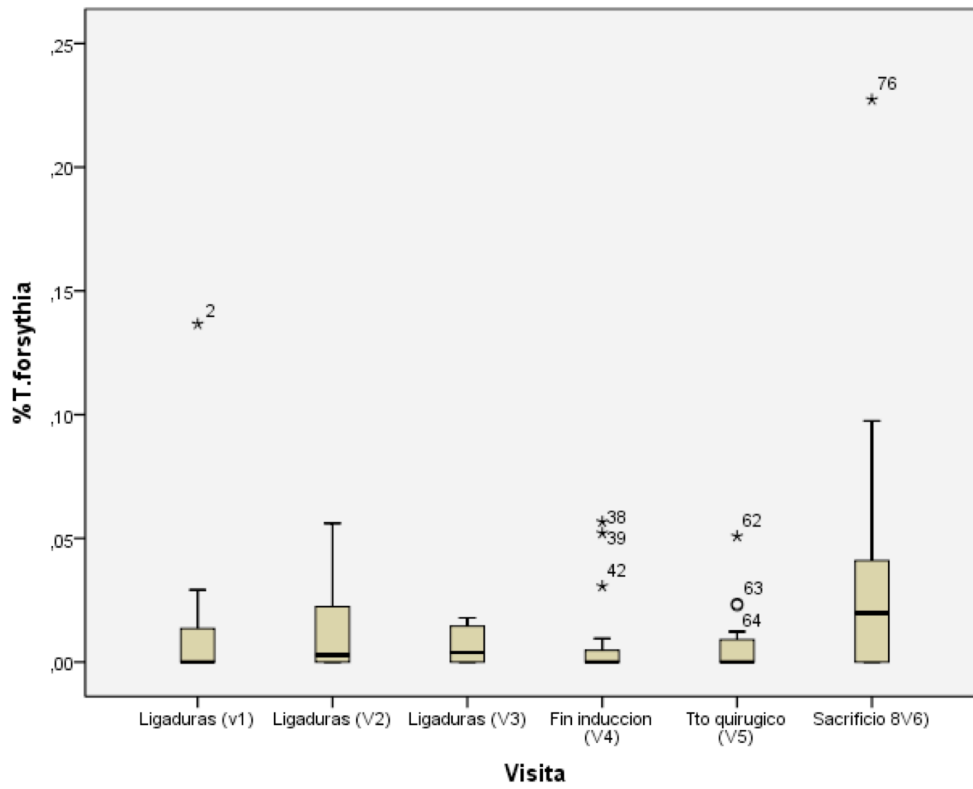


Diagrama 7 - Porcentaje *T. forsythia*

Prevalencia de especies anaerobias.

La tabla 3 muestra la prevalencia (%), de las especies anaerobias presentes en las muestras de placa subgingival, durante las distintas fases del estudio. A pesar de observarse algunas variaciones en el transcurso del tratamiento, *P. gingivalis* y *P. intermedia* se detectan con una frecuencia de cerca del 100% en todas las muestras,

mientras que las muestras correspondientes a *P. micros* y *T. forsythia* son detectadas entre 40% y 60% de las muestras entre las visitas evaluadas.

Especies Anaerobias	Prevalencia Especies Anaerobias (%)					
	Visitas					
	Ligaduras (V1)	Ligaduras (V2)	Ligaduras (V3)	Fin de inducción (V4)	Tratamiento Quirúrgico (V5)	Sacrificio (V6)
<i>P. gingivalis</i>	93,8	100	100	100	100	100
<i>P. intermedia</i>	93,8	68,8	100	93,8	100	92,9
<i>P. micros</i>	-	43,8	40	18,8	18,8	-
<i>T. forsythia</i>	43,8	56,3	60	25	31,3	71,4
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	-	-	-

Tabla 3 - Frecuencia de detección de patógenos periodontales, distribuidas por fases de tratamiento.

Discusión

Este estudio experimental fue diseñado con la intención de determinar la influencia de ciertos patógenos periodontales en el curso de la enfermedad periimplantaria. Las muestras utilizadas en el estudio fueron sometidas a técnicas de cultivo consideradas como el estándar de referencia, tanto por los resultados obtenidos en investigaciones anteriores, como también por su simplicidad y funcionalidad (D'Ercole et al. 2008). Utilizando medios de cultivo enriquecidos y específicos se garantiza una alta sensibilidad que resulta en resultados óptimos y objetivos en cuanto a lo que se desea o espera obtener de estas muestras.

La muestra obtenida en este trabajo muestra datos en cuanto a las variables microbiológicas que podrían resultar interesantes y muy útiles a la hora de reformular el protocolo para la inducción y tratamiento de la periimplantitis. Un ejemplo de ello resultan los datos correspondientes a la prevalencia (Tabla 3) , en los que podemos observar que patógenos periodontales como son *T.forsythia*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* cuyos valores para la muestra correspondiente al tratamiento quirúrgico (Visita 5) son un 100% para *P. gingivalis* y *P. intermedia*, logrando mantenerse casi invariables hasta el momento del sacrificio y en el caso de *T. forsythia* llegando a mostrar un incremento considerable pasando de una frecuencia de detección en la muestra correspondiente al tratamiento de un 31.3%

hasta un 71.4 %. Estos pueden ser considerados como un indicio de la falta de efectividad del tratamiento aplicado, tanto por el protocolo, como también por el manejo de muestra y de los medios utilizados. Especies como *P. gingivalis* se encuentran asociada a la presencia de bolsas periodontales profundas y a la pérdida de inserción así como a localizaciones activas en casos de enfermedad periodontal (Bainbridge et al. 2002). La concentración del microorganismos tiende a reducirse tras el tratamiento pero se mantiene en localizaciones recidivantes o refractarias (Chaves et al. 2000). Lo cual puede explicarse por la capacidad de *P. gingivalis* de invadir las células epiteliales, tejidos conectivos sub-epiteliales. En el caso de *P. intermedia* que su presencia ha sido asociada a la progresión de la enfermedad (Byrne et al. 2009).

Observando los resultados sobre los recuentos individuales de cada bacteria es evidente la variabilidad que existe en los valores para cada especie. Entre estos resultados podemos encontrar que *P. gingivalis* se muestra como la especie predominante en cuanto a recuentos individuales (9.02×10^5 UFC/ml) y cuyo valor en la última muestra correspondiente a la fase post-tratamiento se ve notablemente aumentado con respecto a las otras especies. Especie que se detecta de manera infrecuente y en bajas cantidades en sujetos libres de patologías periodontales, como también es frecuente en casos de formas destructivas de la enfermedad

(Mombelli & Décaillet 2011). Este tipo de microorganismo posee una fuerte relación con casos de enfermedad periodontal destructiva, inducida por medio de ligaduras en perros y otros animales, hecho que queda evidenciado en la literatura (Jan Lindhe 2007) (Haffajee & Socransky 1994) (Holt et al. 1987).

A lo largo del estudio se ha logrado observar que estos resultados coinciden para otras especies anaerobias, como *T. forsythia* en cuanto al recuento individual (4.13×10^4 UFC/ml) y con una prevalencia en la última muestra tomada al momento del sacrificio de un 71.4% representando cerca del 5% del porcentaje total de cepas anaerobias para esta muestra. Al mismo tiempo en el caso de las muestras para *P. intermedia* se pudo ver un claro descenso entre las distintas etapas de la inducción, post-tratamiento y antes del sacrificio, lo que puede ser tomado como un indicio de que la secuencia de tratamiento tomada podría resultar efectiva para la eliminación de esta especie. Dicha especie junto con *P. gingivalis* ha sido encontradas y relacionada en mayor medida con implantes asociados a enfermedad periimplantaria (G. R. Persson & Renvert 2013). Estas dos especies junto con otras como *T.socranskii*, *S. intermedius* entre otras, son encontradas a un nivel cuatro veces superior en casos de periimplantitis comparados con implantes sanos. El mismo estudio logra identificar a *T. forsythia* con cerca del 50% de los implantes afectados por periimplantitis.

Estudios utilizando el modelo animal en perros y siguiendo parámetros similares en cuanto a la inducción de la enfermedad periimplantaria (Tillmanns et al. 1998), logran resultados similares en cuanto a las especies antes mencionadas, llegando a observar un aumento significativo en los valores correspondientes a *P. gingivalis* a los 6 meses, luego de ser comparados con las muestras correspondientes al baseline del estudio. Shibli y cols (2003) (Shibli et al. 2003) obtienen resultados similares en cuanto a la presencia de *P. gingivalis*, al transcurrir 40 días de la inducción, fue detectada en el 33.4% de los implantes y *P. intermedia* que pasa de un 13.89% de las muestras en el baseline a 100% de los implantes en el resto de los períodos analizados.

Limitaciones del estudio

En cuanto a la estructura del protocolo utilizado a nivel de transporte y manejo de muestras en el laboratorio, parece no existir ningún problema, o al menos en este caso parece no traer ningún problema en el estudio. Ahora bien una de las primeras observaciones que se podría hacer en base al estudio, es la del tamaño muestral, que podría llegar a considerarse insuficiente. Si acudimos a la bibliografía existente podremos observar antecedentes en los cuales utilizando un tamaño muestral similar, los autores llegan a obtener resultados satisfactorios (L. G. Persson et al. 1999; Cook & Rust-Dawicki 1994; Wetzel et al. 1999; Hürzeler et al.

1995; Hürzeler et al. 1997). Dado este hecho se considera necesario la revisión del protocolo de toma de muestras, individualizando las mismas. De manera que finalmente se obtenga una muestra más amplia y homogénea, sin que esto requiera un aumento de sujetos de estudio que puedan incrementar los costes y complicar la viabilidad del estudio.

Un factor que puede influir dentro del estudio es la naturaleza de las muestras utilizada. A pesar de mostrar grandes similitudes a nivel de género y una compensación a nivel genético revelada en la mayoría de las cepas investigadas, la flora bacteriana subgingival de los perros muestran diferencias en cuanto a las especies, comparadas con la flora subgingival presente en los seres humanos (Dahlén et al. 2011). En el caso específico de los perros de raza Beagle, presentan en estado de salud periodontal porcentajes altos de bacterias gram negativas, sumado a esto tenemos la presencia en casos de enfermedad de *Prevotella melaninogenica*, una especie que no se encuentra presente en seres humanos (Weinberg & Bral 1999). A lo que se suman la variabilidad en cuanto a formación ósea y conformación de los defectos óseos (Giannobile et al. 1994).

Por ultimo en este apartado vale la pena mencionar el hecho de que este proyecto de investigación forma parte de una línea de investigación cuyo objetivo es valorar el efecto combinado de la terapia de tratamiento quirúrgica, mecánica y química

contra la periimplantitis. Entre las variables que han sido tomadas en cuenta dentro del trabajo se encuentran el comportamiento a nivel clínico de los tejidos, los niveles de hueso formado luego del tratamiento (Variable histológica). Por lo que para obtener un enfoque mas adecuado, sería más adecuado el observar todos los factores como un conjunto, entre ellos se incluyen las variables microbiológicas que se han analizado dentro de esta investigación.

Conclusiones

El estudio presentado ha servido para identificar la presencia y conformación del biofilm bacteriano presente en implantes a lo largo del proceso de inducción y tratamiento de enfermedad periimplantaria; Sin embargo los resultados arrojados no han dado valores estadísticamente significativos entre las distintas etapas en las que se realizó el proceso de inducción, tratamiento y sacrificio en los animales, por lo que son necesarios estudio futuros que analicen estas variables microbiológicas, combinado con un aumento del tamaño muestral. Todo ello, implementado con datos obtenidos de las variables clínicas y radiográficas.

Índice

Introducción	2
<i>Enfermedades periimplantarias</i>	5
I. Mucositis periimplantaria	6
II. Periimplantitis	7
III. Características de la lesión periimplantaria	9
IV. Etiología de las enfermedades periimplantarias	11
V. Modelos de experimentación animal	13
VI. Modelo experimental en perros.	14
Material y métodos	17
I. Dilución de las muestras.	22
II. Inoculación.	22
III. Incubación.	23
IV. Análisis estadístico.	23
Resultados	25
Discusión	31
Conclusiones	37
Referencias bibliográficas	39

Referencias bibliográficas

- Albrektsson, T., Zarb, G. & Worthington, P., 1986. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. ... *Maxillofac Implants*.
- Albuquerque, C. et al., 2012. Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *The Veterinary Journal*, 191(3), pp.299–305.
- Amin, H.D. et al., 2013. Effects of enamel matrix proteins on multi-lineage differentiation of periodontal ligament cells in vitro. *Acta biomaterialia*, 9(1), pp.4796–4805.
- Anon, 2013. Academy report: peri-implant mucositis and peri-implantitis: a current understanding of their diagnoses and clinical implications. *Journal of periodontology*, 84(4), pp.436–443.
- Ardekian, L., Oved-Peleg, E. & Mactei, E., 2006. The Clinical Significance of Sinus Membrane Perforation During Augmentation of the Maxillary Sinus. *Journal of oral and ...*
- Bainbridge, B.W., Coats, S.R. & Darveau, R.P., 2002. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology*, 7(1), pp.29–37.
- Berglundh, T. et al., 1992. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*, 3(1), pp.1–8.
- Berglundh, T. et al., 1991. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical oral implants research*, 2(2), pp.81–90.
- Berglundh, T., Zitzmann, N.U. & Donati, M., 2011a. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of clinical periodontology*, 38, pp.188–202.
- Berglundh, T., Zitzmann, N.U. & Donati, M., 2011b. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *Journal of clinical periodontology*, 38 Suppl 11, pp.188–202.

- Bhardwaj, A. & Bhardwaj, S.V., 2012. Contribution of Animal Models in Periodontal Research. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 6(3), pp.150-157.
- Byrne, S.J. et al., 2009. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque. *Oral microbiology and immunology*, 24(6), pp.469-477.
- Chaves, E.S. et al., 2000. Persistent bacterial colonization of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *Journal of clinical periodontology*, 27(12), pp.897-903.
- Cook, S.D.S. & Rust-Dawicki, A.M.A., 1994. In vivo evaluation of CSTi dental implants in the presence of ligature-induced peri-implantitis. *Journal of Oral Implantology*, 21(3), pp.191-200.
- D'Ercole, S.S. et al., 2008. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiologica*, 31(3), pp.383-391.
- Dahlén, G. et al., 2011. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *Journal of Periodontal Research*, 47(3), pp.354-364.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp.167-193.
- Flemming, H.-C. & Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), pp.623-633.
- Fransson, C.C. et al., 2005. Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clinical oral implants research*, 16(4), pp.440-446.
- Friskopp, J. & Hammarström, L., 1980. A comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus. *Journal of periodontology*, 51(10), pp.553-562.
- Gattani, D. & Salman T, A., 2011. Peri-implant Diseases: Pathogenesis and Treatment. *Journal of Clinical Implant Dentistry*, 2(January-April), pp.23-30.
- Giannobile, W.V.W., Finkelman, R.D.R. & Lynch, S.E.S., 1994. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *Journal of periodontology*, 65(12), pp.1158-1168.

- Goodacre, C.J.C. et al., 2003. Clinical complications with implants and implant prostheses. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), pp.121-132.
- Haffajee, A.D.A. & Socransky, S.S.S., 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, pp.78-111.
- Heitz-Mayfield, L.J.A., 2008. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of clinical periodontology*, 35(8 Suppl), pp.292-304.
- Heitz-Mayfield, L.J.A. & Lang, N.P., 2010. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 53(1), pp.167-181.
- Holt, S.C.S. et al., 1987. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*, 239(4835), pp.55-57.
- Hürzeler, M.B. et al., 1995. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 1: Clinical findings and histologic observations. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 10(4), pp.474-484.
- Hürzeler, M.B.M. et al., 1997. Treatment of peri-implantitis using guided bone regeneration and bone grafts, alone or in combination, in beagle dogs. Part 2: Histologic findings. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 12(2), pp.168-175.
- Isaka, J. et al., 2001. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of periodontology*, 72(3), pp.314-323.
- Jan Lindhe, N.P.L.T.K., 2007. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2 Volumes - 5Th Edition. pp.1-1393.
- Kanno, T. et al., 2012. Simultaneous sinus lifting and alveolar distraction of a severely atrophic posterior maxilla for oral rehabilitation with dental implants. *International journal of dentistry*, 2012, p.471320.
- Kim, S.-G., Mitsugi, M. & Kim, B.-O., 2005. Simultaneous sinus lifting and alveolar distraction of the atrophic maxillary alveolus for implant placement: a preliminary report. *Implant dentistry*, 14(4), pp.344-346.
- Lang, N.P., Berglundh, T. Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology, 2011. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. In *Journal of clinical periodontology*. Journal of clinical periodontology. pp. 178-181.

- Lang, N.P., Karring, T. & Lindhe, J., 1999. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology*, Quintessenz Verlags-GmbH.
- Lindhe, J. et al., 1992. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clinical oral implants research*, 3(1), pp.9-16.
- Lindhe, J., Meyle, J. Group D of European Workshop on Periodontology, 2008a. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. In *Journal of clinical periodontology*. *Journal of clinical periodontology*. pp. 282-285.
- Lindhe, J., Meyle, J. on behalf of Group D of the European Workshop on Periodontology, 2008b. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 35, pp.282-285.
- McDermott, N.E. et al., 2003. Complications of dental implants: identification, frequency, and associated risk factors. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 18(6), pp.848-855.
- Misch, K. & Wang, H.-L., 2008. Implant Surgery Complications: Etiology and Treatment. *Implant dentistry*, 17(2), pp.159-168.
- Mombelli, A. & Décaillot, F., 2011. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of clinical periodontology*, 38 Suppl 11, pp.203-213.
- Mombelli, A., Nyman, S., et al., 1995a. Clinical and microbiological changes associated with an altered subgingival environment induced by periodontal pocket reduction. *Journal of clinical periodontology*, 22(10), pp.780-787.
- Mombelli, A. et al., 1987. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral microbiology and immunology*, 2(4), pp.145-151.
- Mombelli, A., Marxer, M., et al., 1995b. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 22(2), pp.124-130.
- Mombelli, A., Buser, D. & Lang, N.P., 1988. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral microbiology and immunology*, 3(3), pp.113-120.
- Persson, G.R. & Renvert, S., 2013. Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clinical implant dentistry and related research*, pp.n/a-n/a.

- Persson, L.G. et al., 1999. Resolution of peri-implantitis following treatment. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*, 10(3), pp.195–203.
- Proussaefs, P. et al., 2004. Repair of the perforated sinus membrane with a resorbable collagen membrane: a human study. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 19(3), pp.413–420.
- Quirynen, M., De Soete, M. & van Steenberghe, D., 2002. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical oral implants research*, 13(1), pp.1–19.
- Renvert, S.S. et al., 2007. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical oral implants research*, 18(4), pp.509–516.
- Roos-Jansåker, A.-M., Lindahl, C., et al., 2006a. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *Journal of clinical periodontology*, 33(4), pp.290–295.
- Roos-Jansåker, A.-M., Renvert, H., et al., 2006b. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *Journal of clinical periodontology*, 33(4), pp.296–301.
- Schroeder, A., Pohler, O. & Sutter, F., 1976. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. *Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie / SSO*, 86(7), pp.713–727.
- Shibli, J.A. et al., 2008. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical oral implants research*, 19(10), pp.975–982.
- Shibli, J.A.J. et al., 2003. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 18(3), pp.383–390.
- Struillou, X. et al., 2010. Experimental animal models in periodontology: a review. *The open dentistry journal*, 4, pp.37–47.
- Tarnow, D.P., Cho, S.C. & Wallace, S.S., 2000. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *Journal of periodontology*, 71(4), pp.546–549.
- Tarnow, D.P., Magner, A.W. & Fletcher, P., 1992. The Effect of the Distance From

the Contact Point to the Crest of Bone on the Presence or Absence of the Interproximal Dental Papilla. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1992.63.12.995>.

Tatum, H., Jr, 1986. Maxillary and sinus implant reconstructions. [Dent Clin North Am. 1986] - PubMed - NCBI. *Dental Clinics of North America*.

Tillmanns, H.W. et al., 1998. Evaluation of three different dental implants in ligature-induced peri-implantitis in the beagle dog. Part II. Histology and microbiology. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 13(1), pp.59-68.

Weinberg, M.A. & Bral, M., 1999. Laboratory animal models in periodontology. *Journal of clinical periodontology*, 26(6), pp.335-340.

Wetzel, A.C.A. et al., 1999. Attempts to obtain re-osseointegration following experimental peri-implantitis in dogs. *Clinical oral implants research*, 10(2), pp.111-119.

Zhang, C. et al., 2012. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Archives of oral biology*, 57(10), pp.1395-1407.

Zhao, Y.-H. et al., 2013. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials*, 34(22), pp.5506-5520.

Zitzmann, N.U. & Berglundh, T., 2008. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology*, 35, pp.286-291.

Zitzmann, N.U. et al., 2001. Experimental peri-implant mucositis in man. *Journal of clinical periodontology*, 28(6), pp.517-523.