

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

JORGE GOBARA JUNIOR

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM
PERI-IMPLANTITE**

**SÃO PAULO
2014**

JORGE GOBARA JUNIOR

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM
PERI-IMPLANTITE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Implantodontia, do Programa de Pós-graduação da Universidade de Santo Amaro.

Orientadora: Profa. Dr^a. Debora Pallos

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

**São Paulo
2014**

JORGE GOBARA JUNIOR

ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM PERI-
IMPLANTITE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Mestrado em Odontologia do Programa de Pós-Graduação da Universidade de Santo Amaro.

Data de Aprovação ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Nome Completo (orientador): Prof. Dra. Debora Pallos
Titulação - Doutora
Instituição Universidade de Santo Amaro - UNISA

Nome Completo: Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk
Titulação – Doutor
Instituição- Universidade de Santo Amaro - UNISA

Nome Completo: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva
Titulação - Doutor
Instituição – Universidade de São Paulo - USP

CONCEITO FINAL: _____

A minha amada esposa Juliana pelo amor, paciência, por toda doação durante esses anos e por todos os momentos da realização deste mestrado. Pelo companheirismo e todo o carinho nos momentos alegres e nos momentos difíceis também. Pelo incentivo e por compreender e aceitar as minhas ausências. Pela alegria e riqueza de dividir a vida com você, por todos os sonhos já vividos e por todos aqueles que ainda vamos viver.

A minha maior riqueza minha filha Anna Beatriz, tudo o que eu fiz, faço e irei fazer será sempre pensando em você.

Aos meus amados pais Jorge e Cida pelo amor, carinho, dedicação, incentivo, por me ensinarem a ser quem eu sou hoje, e por abdicarem de sonhos próprios para que eu pudesse realizar os meus.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk agradeço a oportunidade que me foi conferida de fazer parte deste curso de mestrado e por todo conhecimento ministrado.

Agradeço especialmente, a minha orientadora, Profa. Dra. Débora Pallos, por ter aceito a orientação, pelos ensinamentos passados a cada encontro e, principalmente, pela dedicação.

Agradeço a todos do corpo docente do mestrado em Odontologia da Universidade de Santo Amaro (UNISA), por todo o respeito, atenção e disponibilidade.

Agradeço a minha família e amigos por compreender minha ausência durante a realização deste projeto.

Aos amigos de turma Marco, Isaias, Fausto, Paulo, Jaime, Fernanda e Renato, pelo companheirismo.

Resumo

Objetivo: o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-4, TNF- α e MIP-1 β na saliva de pacientes com peri-implantite. Determinar se esses biomarcadores podem ser utilizados como método auxiliar de diagnóstico da doença peri-implantar.

Metodologia: foram coletadas amostras de saliva de 52 pacientes os quais foram divididos em três grupos: Saudável - nPimp (n=21), Peri-implantite - Pimp (n=21) e Desdentados - Des (n=10). A peri-implantite foi caracterizada por perda óssea em forma de taça, reabsorção óssea maior do que 3mm, inflamação da mucosa peri-implantar exibindo sangramento à sondagem e/ou supuração. Parâmetros clínicos como índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem, supuração foram avaliados na forma dicotômica. As medidas de profundidade de sondagem e perda de inserção clínica foram determinada em 6 sítios por implante (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mésio-lingual). As citocinas foram mensuradas por meio de um imunoensaio Multiplex.

Resultados: a quantidade de IL-1 β na saliva obteve significância somente quando comparada entre os grupos Pimp vs Des $p < 0,05$, já a IL-4 não apresentou significância quando comparada entre os 3 grupos, MIP-1 β obteve significância quando comparado os grupos Pimp vs Des $p < 0,001$ e nPimp vs Des $p < 0,002$ e não foi significativo quando comparado Pimp vs nPimp, TNF- α obteve significância quando comparado os grupos Pimp vs Des $p < 0,002$ e nPimp vs Des $p < 0,002$ e não foi significativa quando comparado Pimp vs nPimp.

Conclusão: não foram encontradas diferenças significantes na expressão das citocinas IL-1 β , IL-4, MIP-1 β e TNF- α na saliva entre os pacientes com implantes saudáveis e doentes, portanto com os resultados deste estudo estes biomarcadores não estão indicados para diagnóstico da doença peri-implantar.

Descritores: peri-implantite, citocinas, saliva, implante dental

Abstract

Objective: the aim of this study was to evaluate the levels of IL - 1 β , IL - 4, TNF - α and MIP- 1 β in saliva from patients with peri-implantitis. Determine if. these biomarkers can be used as a auxiliary method to diagnostic peri-implant disease.

Methodology: were collected saliva samples from 52 patients who were divided into three groups: healthy - nPimp (n = 21), Peri-implantitis - Pimp (n = 21) and edentulous - Des (n = 10). The peri-implantitis was characterized by bone loss like cup-shaped, more than 3mm of bone resorption, inflammation of peri-implant mucosa showing bleeding on probing and/or suppuration. Clinical parameters such as plaque index, gingival index, bleeding on probing, suppuration were evaluated in a dichotomous manner. Measurements of probing depth and clinical attachment loss were determined at 6 sites per implant (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual). The cytokines were measured using a multiplex immunoassay.

Results: The amount of IL-1 β in saliva obtained significance only when compared between the groups Pimp vs Des $p < 0.05$, the IL-4 showed no significance when compared among the 3 groups, MIP-1 β showed significance when compared the Pimp x Des $p < 0.001$ and nPimp x Des $p < 0.002$ groups and was not significant when compared Pimp x nPimp, TNF- α showed significance when comparing the Pimp vs Des $p < 0.002$ and nPimp x Des $p < 0.002$ and was not significant when compared Pimp vs nPimp.

Conclusion: No significant differences were found in the expression of cytokines IL-1 β , IL-4, MIP-1 β and TNF- α in saliva among patients with healthy and peri-implantitis implants.

Key-words: peri-implantitis, cytokines, saliva, dental implant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do Multiplex	29
Figura 2. Gráfico apresentando valores de IL-1 β	32
Figura 3. Gráfico apresentando valores de IL-4	32
Figura 4. Gráfico apresentando valores de MIP-1 β	33
Figura 5. Gráfico apresentando valores de TNF- α	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das citocinas associadas às células T <i>helper</i>	22
Tabela 2. Descrição dos dados clínicos dos pacientes	30
Tabela 3. Resultados das citocinas em pg/ml	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	-	Acúmulo de placa
EMAPII	-	Polipeptídio ativador de monócito endotelial II
FCPI	-	Fluído crevicular peri-implantar
FGC	-	Fluído gengival crevicular
IFN- γ	-	Interferom γ
IL	-	Interleucina
IP-10	-	Proteína indutora de IFN 10
MC	-	Mucosite
MCP-1	-	Proteína quimiotática do macrófago – 1
MIP	-	Proteína inflamatória do macrófago
MMP	-	Matriz de metaloproteinase
OPG	-	Osteoprotegrina
PAG	-	Periodontite agressiva generaliza
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
PG/ML	-	Picogramas por milímetros
PI	-	Peri-implantite inicial
PiS	-	Peri-implantite severa
PS/mm	-	Profundidade de sondagem em milímetros
TGF- β	-	Fator de crescimento transformado β
Th	-	T helper
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral
RANKL	-	Receptor ativador do fator nuclear kappa β ligante
RANTES	-	Citocina regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
SM	-	Sangramento marginal
SS	-	Sangramento a sondagem
SUP	-	Supuração
TCLE	-	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 REVISÃO DE LITERATURA	15
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Critério de exclusão.....	26
3.2 Avaliação clínica dos implantes.....	27
3.3 Exame Clínico e Radiográfico	27
3.4 Coleta de saliva	27
3.5 Análise das citocinas pelo método Multiplex	28
3.6 Análise estatística.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Resultados da quantificação de citocinas pelo método do Multiplex	31
5 DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

O conceito de osseointegração surgiu em 1969 e foi definido por Brånemark e colaboradores como uma conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vivo e organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional.

Com a crescente popularidade dos implantes dentários a presença de complicações relacionadas aos implantes vem sendo discutida na literatura. A prevalência de peri-implantite é de 10 a 20% após 5 a 10 anos da instalação do implante e recebimento de carga funcional (MOMBELLI, MÜLLER E CIONCA, 2012).

Caracteriza-se como peri-implantites processos inflamatórios destrutivos ao redor de implantes osseointegrados que estejam em função, que levam a formação de bolsa e perda óssea marginal com perda do osso de suporte (ALBREKTSSON & ISIDOR, 1994, MOMBELLI, 1999). A doença peri-implantar pode ser dividida em mucosite e peri-implantite. A mucosite consiste em uma inflamação relacionada aos tecidos de proteção, enquanto que a peri-implantite é uma resposta inflamatória irreversível que leva a perda óssea alveolar, causando reabsorção óssea podendo levar a perda do implante dentário (BERGLUNDH et al. 2002; PONTORIERO et al. 1994).

Segundo Zitzmann & Berglundh (2008), sangramento a sondagem está sempre presente na peri-implantite. Outros sinais clínicos da doença pode incluir supuração, aumento da profundidade de sondagem, recessão da mucosa, fístula e hiperplasia gengival (HEITZ-MAYFIELD, 2008)

LISKMANN et al. 2006; STASHENKO et al 1991 consideram o biofilme dental como fator etiológico primário das doenças peri-implantares. A intensidade da resposta inflamatória à produtos bacterianos, tais como o lipopolissacarídeos e endotoxinas, gera a liberação das citocinas pelas células inflamatórias do hospedeiro. Tais citocinas podem estimular a perda óssea peri-implantar (MONTES et al. 2009; MURATA et al. 2002).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como as interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), estão associadas com a progressão da doença devido à sua capacidade em estimular a reabsorção óssea (KORNMAN et al. 1997; KREUTZ et al. 1992).

Citocinas são proteínas e glicoproteínas extracelulares solúveis que atuam como funções regulatórias intercelulares de células envolvidas em resposta inflamatória, crescimento celular, diferenciação celular, morte celular, angiogênese, e processos de desenvolvimento e reparação destinadas à restauração de homeostasia. (Oppenheim, 2001)

Em geral, na resposta imune do hospedeiro, as citocinas envolvidas na resposta mediada por células T *helper* (Th) 1 por exemplo, IL-1 β , IL-12 e o interferon- γ (IFN- γ) induzem um processo celular mediado, enquanto citocinas de resposta de Th2 (por exemplo, IL-4 e IL-10), estimulam a produção de predominantemente anticorpos (MACHTEI et al. 2006).

A saliva humana é composta por 98% de água e 2% de outros componentes, tais como eletrólitos, muco, compostos antibacterianos e várias enzimas. A saliva possui várias funções incluindo lavagem, solubilização de substâncias alimentares, lubrificação dos tecidos moles, formação de bolo alimentar, diluição de detritos, deglutição, fala e facilitador da mastigação. Além disso, os componentes da saliva contribuem para mucosas de revestimento, a digestão e defesa antibacteriana. Alguns biomarcadores associados as doenças periodontais tem sido detectadas na saliva como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e matriz de metaloproteinases MMP-8 e MMP-9 (RATHNAYAKE et al. 2013).

Vários estudos têm mostrado a saliva como um meio de diagnóstico de doenças. Poucos trabalhos na literatura dosaram biomarcadores salivares em pacientes com peri-implantite. Portanto justifica este estudo que visa dosar biomarcadores na saliva de pacientes com implantes saudáveis e com peri-implantite.

1 REVISÃO DE LITERATURA

Mediadores inflamatórios são liberados a partir de células do periodonto inflamado durante a periodontite, e estes incluem a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada por células diferentes na lesão inflamatória, principalmente por monócitos e/ou macrófagos, a IL-6 atua tanto como citocina pró inflamatório como anti-inflamatória, capaz de induzir crescimento e diferenciação de células T e B, e também indução de proteínas na fase aguda. A IL-8 é uma quimioquina, produzida principalmente por macrófagos e células epiteliais após estimulação inflamatória e desempenha um papel causal na fase inflamatória aguda, ativando os neutrófilos, portanto, tem um papel importante na patogênese da periodontite (HARADA et al. 1994).

Kao et al. (1995) compararam os níveis de IL-1 β em fluído gengival crevicular (FGC) em pacientes tanto com implante saudável quanto com implante de diagnóstico clínico de peri-implantite em doze pacientes, os quais deveriam apresentar pelo menos um implante saudável e um implante com peri-implantite em locais anatômicamente semelhantes. Os critérios utilizados para implante saudável e implante com peri-implantite respeitaram o rápido aumento de profundidade de bolsa (≥ 2 mm com aumento ao longo de 6 meses), supuração, evidência radiográfica de perda óssea e dor. Implantes saudáveis não exibiram evidência radiográfica de perda óssea, sem profundidade de bolsa superior a 4mm, e nenhuma dor. Os locais de implantes saudáveis e com peri-implantite foram isolados para coleta de amostra do fluido gengival. Periopaper foram colocados no interior do sulco gengival para realização da coleta de FGC. A dosagem de IL-1 β foi realizada pela técnica ELISA. Os resultados dos níveis de IL-1 β nos 12 pacientes, foi que apenas um paciente apresentou sinais clínicos de doença aguda indicada pela presença de alterações granulomatosas e supuração. Na maioria dos pacientes, houve mudanças mínimas na apresentação gengival quando comparando implantes saudáveis e falhos. Somente com o monitoramento de aumento da profundidade da bolsa e aumento da radiolucência ao redor do implante foi detectado como peri-implantite. Os resultados indicaram aumento estatisticamente significativo na produção de IL-1 β associado com os implantes perdidos. O aumento de 320% na produção de IL-1 β estatisticamente indica que IL-1 β pode discriminar implantes saudáveis contra implantes com peri-implantite.

Panagakos et al. (1996) testaram a hipótese de que as mesmas citocinas podem estar envolvidas tanto na resposta inflamatória, quanto em tecidos danificados, observados em peri-implantite. Um total de 50 implantes em 13 pacientes foram examinados clinicamente e amostras de FGC foram obtidos a partir de quatro sítios por implante. Estas amostras foram analisadas por um ensaio imunoabsorvente (ELISA) para detectar a presença e os níveis de IL-1 β , TNF- α e o precursor da citocina, pró-IL-1 β . Com base nos dados clínicos, os implantes foram classificados em três grupos. O grupo controle incluiu 17 saudáveis, 27 com peri-implantite precoce, e 6 implantes peri-implantite avançada. Os resultados indicaram que os implantes clinicamente saudáveis tinham níveis muito baixos de IL-1 β ($59,47 \pm 15,55$ pg/sítio); os implantes com peri-implantite precoce e avançada tinham níveis elevados ($460,77 \pm 35,67$ pg/sítio e $191,10 \pm 21,60$ pg/sítio, respectivamente), TNF- α não foi detectada em todas as amostras. Além disso, amostras com níveis elevados de IL-1 β também tinham níveis elevados de pro-IL-1 β , ($233,13 \pm 14,60$ pg/sítio). Com base nesses resultados, e o fato de que a periodontite e peri-implantite são semelhantes em manifestação clínica e perfil de agente patogênico, parece que a IL-1 β estimulada na peri-implantite também pode ser a mesma citocina que é liberada na periodontite. A IL-1 β pode ser a causa para a destruição rápida e extensa dos tecidos de suporte visto durante este processo.

Salcetti et al. (1997) pesquisaram os níveis de fator inflamatório e aumento de mediadores e patógenos bacterianos associados com implantes perdidos, em comparação com implantes saudáveis. Vinte e um pacientes com falência de implante (grupo 1) e 8 pacientes apenas com implantes saudáveis (grupo 2) foram incluídos. Quinze dos 21 pacientes com implantes falhos (grupo 1) também apresentavam pelo menos um implante estável e saudável. Amostras de placa foram examinadas usando sondas de DNA para 40 microrganismos diferentes. Amostras de FGC foram coletadas para analisar pelo método ELISA os catabólicos de reabsorção óssea agonistas da prostaglandina E2 (PGE₂), a IL-1 β e IL-6, anabólicos de crescimento, formadores de osso o fator de crescimento transformado β (TGF- β) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Embora tendências positivas foram observadas, não houve diferenças significativas em qualquer um dos mediadores para os fatores microbianos, inflamatórios ou de crescimento no grupo 1. Este estudo encontrou aumento significativo no FGC de PGE₂, IL-1 β e PDGF em locais com implante

falho em comparação com implantes de controle, saudáveis. Os níveis de TGF- β não foi clinicamente detectável nos níveis de sensibilidade determinados pelo kit ELISA. Os níveis médios de PGE₂ foram encontrados como sendo significativamente mais elevada nos locais de perda (74,2 ng/mL) e locais estáveis (64,2 ng/mL) de um grupo de pacientes contra os locais do grupo controle não-doentes (36,1 ng/mL). Uma tendência semelhante foi observada nos níveis de IL-1 β , com o nível mais elevado entre os locais de perda (761,5 ng/mL) e locais estáveis (626,7 ng/mL) nos pacientes do grupo 1 contra as pacientes do grupo 2 (255,4 ng/mL). Esses níveis também são estatisticamente significativos para os locais de perda versus os locais de controle e para os locais estáveis *versus* os locais controle. Não houve diferença significativa nos níveis médios de PGE₂, IL-1 β ou PDGF, no mesmo indivíduo, quando os locais de implante perdidos foram comparados com os locais de implantes estáveis no grupo 1.

Kabashima et al. (2002), avaliaram dez pacientes adultos exibindo doença periodontal de moderada a severa evidenciado por vários sítios com uma profundidade de sondagem $\geq$ 6mm e sangramento à sondagem e que demonstrou radiograficamente uma reabsorção óssea alveolar compreendendo entre 50% e 70% do comprimento da raiz da maior parte dos dentes. A faixa etária desses pacientes era de 34-65 anos (média de idade 45 anos). As amostras de tecidos gengivais inflamados foram obtidos durante o tratamento periodontal. Amostras do grupo controle (saúde periodontal) foram obtidas durante o tratamento ortodôntico, onde foram extraídos os 3º molares inclusos impactados e assim se obteve tecido gengival com saúde periodontal da gengival marginal na face distal do 2º molar, quando se extraiu o pré-molar do paciente removeu-se a papila interdental saudável. Além disso, obteve-se um tecido gengival com saúde periodontal de sujeitos submetidos à cirurgia de aumento de coroa. Foram utilizados três amostras como controle negativo. As amostras foram preparadas para análise imunohistoquímica. Os resultados fornecem uma evidência de interação entre as quimiocinas, tais como proteína quimiotática do macrófago-1 (MCP-1), proteína inflamatória do macrófago (MIP)-1 α , MIP-1 β , proteína indutora de IFN 10 (IP-10), citocina regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais (RANTES), infiltrado celular, incluindo monócitos/macrófagos e células Th1, na progressão da doença inflamatória tal como periodontite. Os resultados sugerem que a MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, RANTES e células produtoras podem modular a patogênese da doença, como a periodontite e

pode ser responsável por estimular a destruição de tecido com a reabsorção óssea alveolar.

Emingil et al. (2005) avaliaram 82 indivíduos que foram divididos em 4 grupos, gengivite, periodontite crônica, periodontite agressiva generalizada e saudável, com o objetivo de examinar os níveis de polipeptídeo ativador monócito endotelial II (EMAP-II), MIP-1 α e MIP-1 β no FGC. Faziam parte do grupo de periodontite crônica 9 mulheres e 17 homens, com idades de 39-63 anos (média de idade $49,9 \pm 6,2$ anos). Esses indivíduos apresentavam perda óssea alveolar de moderada a grave e perda de inserção clínica ≥ 5 mm, profundidade de sondagem ≥ 6 mm em vários sítios de todos os quatro quadrantes da boca, mas sem evidência de progressão rápida. O grupo de periodontite agressiva generalizada consistia de 12 mulheres e 14 homens, com idades entre 18 a 39 anos (média de idade de $28,9 \pm 6,8$ anos). Estes pacientes demonstraram um padrão generalizado de destruição severa e perda do nível clínico de inserção ≥ 5 mm em 8 ou mais dentes; pelo menos três deles eram diferentes incisivos centrais ou primeiros molares. O grupo gengivite incluía 7 mulheres e 8 homens com variação do grau de inflamação gengival, mas sem sinais de perda de inserção. Estes pacientes tinham idades entre 17 a 49 anos (média de idade $31,5 \pm 10,2$ anos). O grupo saudável consistia de 7 mulheres e 8 homens com idades entre 23 a 72 anos (média de idade de $40 \pm 14,4$ anos) que apresentavam profundidade de sondagem < 3 mm, sem perda de inserção clínica, inflamação, sangramento sulcular e perda óssea radiográfica. Nos grupos de periodontite crônica e periodontite agressiva generalizada (PAG) as amostras FGC foram coletadas a partir de um sítio proximal de um dente com ≥ 6 mm de profundidade de sondagem. No grupo gengivite, as amostras de FGC foi colhido a partir de um sítio proximal de um dente com sangramento e profundidade de sondagem ≥ 2 mm. No grupo saudável, amostras do FGC foram coletadas a partir de um sítio proximal de um dente com profundidade de sondagem ≤ 2 mm. As amostras foram analisadas por ensaio imunoenzimático. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de estudo ($p = 0,0008$). Entre os grupos, o PAG apresentou níveis mais altos de EMAP-II comparado com os grupos gengivite e saudáveis ($31,6 - 9,0$ e $8,4$ ng/amostra; $p = 0,0007$ e $0,0017$, respectivamente). Níveis de EMAP-II do grupo PAG também foram maiores em comparação com os do grupo periodontite crônica, mas isso não obteve significância ($31,6$ e $13,3$ ng/amostra, respectivamente, $p = 0,0158$). Os grupos periodontite crônica, gengivite e saudável foram semelhantes nos níveis de EMAP-II ($p >$

0,008). Os grupos PAG, periodontite crônica, gengivite e saudáveis tinham quantidade similar de MIP-1 α total sem diferença significativa. Quando os dados foram expressos em concentração, níveis de MIP-1 α dos grupos PAG, periodontite crônica e gengivites foram significativamente menor em comparação com o grupo saudável ($p < 0,0008$). Os grupos PAG, periodontite crônica, gengivite e saudáveis tinham uma quantidade similar total de MIP-1 β (88,1 - 102,4 - 97,6 e 96,3 pg/amostra, respectivamente, $p = 0,1787$). Quando os dados foram expressos como a concentração, os níveis de MIP-1 β dos grupos periodontite crônica e periodontite agressiva generalizada foram significativamente inferiores aos do grupo saudável ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). O grupo PAG tinha também diminuição significativa dos níveis de MIP-1 β em comparação com o grupo de gengivite ($p = 0,0005$).

Heitz-Mayfield (2008) realizou por meio de revisão sistemática no banco de dados Medline (Ovid), no período entre 1 janeiro de 1950 até 21 janeiro de 2008, a fim de rever as evidências para diagnóstico e os indicadores de risco para doença peri-implantar. Os estudos experimentais e clínicos têm identificado vários critérios de diagnóstico incluindo parâmetros de sondagem, a avaliação radiográfica e análises de fluido peri-implantar e saliva. Análises transversais têm investigado risco potencial de indicadores para a doença peri-implantar, incluindo a má higiene bucal, tabagismo, história de periodontite, diabetes, características genéticas, consumo de álcool e a superfície implante. A profundidade de sondagem, presença de sangramento a sondagem e supuração deveriam ser avaliadas regularmente para o diagnóstico de doenças peri-implantares. As radiografias seriam necessárias para avaliar os níveis de contato do osso ao redor dos implantes. A revisão identificou fortes indícios de que a falta de higiene oral, uma história de periodontite e tabagismo, são indicadores de risco para a doença peri-implantar. Os estudos identificados nessa sistemática têm comentários consideráveis sobre variações no desenho do estudo, o tempo de acompanhamento, definição de populações de pacientes com relação à condição periodontal, medidas de resultados e regimes de terapia de suporte periodontal, além da falta de relatórios sobre a ocorrência de fatores de confusão como o tabagismo e as diferenças de tempo de fazer medições de referência, portanto tornando-se difícil tirar conclusões sólidas. No entanto, as revisões sistemáticas indicam que os indivíduos com história de periodontite estão em maior risco de doença peri-implantar.

Duarte et al. (2009) avaliaram 48 indivíduos e um total de 48 implantes, cujo critério de inclusão foram indivíduos total ou parcialmente desdentados com pelo menos um protocolo Brånemark em função a pelo menos 1 ano. Os indivíduos que participaram do estudo eram não fumantes e sistemicamente saudáveis. Indivíduos parcialmente edêntulos eram periodontalmente saudáveis ou, se eles apresentassem uma história de doença periodontal, eles deveriam ter sido tratados periodontalmente e acompanhados em uma terapia periodontal de suporte. Foram avaliados os seguintes parâmetros: acúmulo de placa (AP); sangramento marginal (SM), presença de supuração (SUP), sangramento à sondagem (SS) profundidade de sondagem (PS). Avaliação radiográfica: a perda óssea foi avaliada de acordo com as radiografias feitas no momento da instalação do implante onde se determinou o nível ósseo inicial e a radiografia para perda óssea peri-implantar. Uma biópsia de tecido mole peri-implantar foi obtido de cada indivíduo. De acordo com os parâmetros clínicos e radiográficos, as 48 biópsias foram divididas em um dos seguintes grupos: implante saudável (IS) (n = 11): PS $\leq$ 4 mm, sem SM, SS, SUP e sem evidência de perda óssea radiográfica; Mucosite (MC) (n = 15): SM e/ou SS e ausência de perda óssea radiográfica e SUP; peri-implantite inicial (PI) (n = 10): PS $\geq$ 5 milímetros com SS e/ou SUP e perda óssea radiográfica envolvendo quatro faces, e peri-implantite severa (PiS) (n = 12): PS $\geq$ 5 milímetros com SS e/ou SUP e perda óssea radiográfica envolvendo mais de 4 faces, após o agrupamento foi realizado. A análise dos dados demonstraram que a IL-12 e TNF- α foram significativamente maiores em PiS, seguido por PI e MC, que não eram diferentes uns dos outros. Foram observados níveis menores de IL-12 e TNF- α em IS ($P < 0,05$). Níveis de IL-4 foram significativamente maiores em IS, seguido por MC, PiS e PI, respectivamente ($P < 0,05$). A expressão de IL-10 foi o mais baixo em IS ($P < 0,05$), enquanto que não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos doentes ($P > 0,05$). Os níveis de osteoprotegrina (OPG) foi significativamente mais elevado em IS, seguido por PI, PiS e MC, respectivamente ($P < 0,05$). Níveis do receptor ativador do fator nuclear kappa β ligante (RANKL) foram menores nos grupos IS e MC, que não diferem umas das outras. A expressão de RANKL progressivamente aumentada, como aumento da gravidade da peri-implantite ($P < 0,05$). A maior relação OPG/RANKL foi observada em IS e a menor em PiS ($P < 0,01$). Não houve diferença na proporção de OPG / RANKL entre MC e PI.

Zanatta et al. (2009) realizaram por meio de uma revisão não sistemática de literatura uma análise dos aspectos imunológicos dos linfócitos Th, bem como a participação destas células na etiopatogenia da periodontite crônica. As células Th são classificadas, baseadas no padrão de citocinas que produzem, em Th1 (IFN- γ) Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) e, mais recentemente, um novo grupo foi identificado, as células Th17 (IL-1 β , IL-17, TNF- α). A resposta imune pode exibir uma característica Th1, que consiste principalmente de uma resposta imune celular pró-inflamatória, uma característica Th2, com aspecto anti-inflamatório e de resposta imune humoral, ou ainda polarização Th17, com ação efetora da imunidade inata. Têm-se sugerido que a destruição dos tecidos na periodontite pode ser resultante de um desequilíbrio na regulação da resposta imune sob controle dos linfócitos Th. Alguns estudos encontraram uma polarização Th1, outros uma polarização Th2. Entretanto, há estudos que não mostraram polarização de resposta Th1 ou Th2. Ainda, evidências recentes têm colocado uma possível polarização de resposta Th17 nas lesões periodontais. Permanece incerto se há uma polarização de resposta Th na periodontite crônica, sendo necessária a elaboração de mais estudos para que se obtenha respostas claras sobre esta questão. A tabela 1 apresenta as principais características das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4 e MIP-1 β .

Teles et al. (2009) realizaram um estudo transversal para comparar os níveis de fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α em amostras de saliva 74 indivíduos com periodontite crônica e 44 indivíduos periodontalmente saudáveis. Os indivíduos periodontalmente saudáveis tinham idade entre 18-65 anos, com pelo menos 20 dentes naturais e sem profundidade de bolsa ou nível de inserção > 3 mm. Os indivíduos com doença periodontal tinham idade 18-65 anos, com pelo menos 20 dentes naturais e 8 ou mais sítios com profundidades de bolsa > 4 mm e perda do nível de inserção > 3 mm. Os níveis de citocina foram determinados por um imunoensaio (Multiplex). Os resultados do imunoensaio revelaram que os níveis da maioria das citocinas estavam dentro da média de quantificação do ensaio. Para o fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos, IL-1 β , IL-4, IL-6 e TNF- α , as amostras estavam acima de 90% dentro da gama dinâmica das curvas padrões. No caso do IFN- γ , 83 % das amostras foram quantificadas, enquanto IL-2, IL-5, IL-8 e IL-10, aproximadamente 50% das amostras estavam na gama dinâmica do ensaio. IL-10 teve o maior percentual de amostras negativas (33%), enquanto a IL-8 teve a maior porcentagem de

valores acima do limite superior da quantificação (34%). O nível médio dos 10 biomarcadores foram inicialmente comparados entre indivíduos com periodontite e periodontalmente saudáveis, utilizando o teste de Mann-Whitney. Os resultados mostraram alta significância estatística dos níveis médios salivares de IL-10 ($p < 0,01$) e IL-5 ($p < 0,05$) no grupo saudável. A IL-8 foi a citocina mais abundante na saliva, com níveis médios ($\pm$ erro padrão da média) de 1945 ± 181 pg/ml e 2268 ± 111 pg/mL, para indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite respectivamente.

Tabela 1. Características das citocinas associadas as células T *helper*

Características das Citocinas Associadas as Células T <i>Helper</i>		
Citocina	Principais Fontes	Principais Atividades
IL-1*	Macrófagos ativados Células B Fibroblastos Neutrófilos Células epiteliais	Ativação das células Th; promoção da maturação das células B; quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos; estimula a reabsorção óssea; estimula fibroblastos a liberarem prostaglandinas e outras citocinas.
IL-4*	Celulas Th Mastócitos Basófilos	Fator de crescimentos para as células Th2; promove reações por IgE; inibe a proliferação e atividade de IL-12; inibe a ativação do macrófago
TNF*	Celulas Th Macrófagos ativados Células NK	Aumenta a fagocitose e quimiotaxia; ativação de osteoclastos; o IFN- γ produzidos pelas células T e NK aumenta a síntese de TNF pelos macrófagos estimulados por LPS
MIP-1 β **	Neutrófilos Monócitos Linfócitos Células não-inflamatórias no local de inflamação	Função regulatória durante as respostas imunes mediadas por células; causa a migração seletiva de monócitos e linfócitos; está envolvida na migração de células CD4 ⁺ .

* ZANATTA *et al.* 2009 **EMINGIL *et al.*, 2005

A segunda citocina mais abundante na saliva foi IL-1 β , com níveis médios de 633 ± 91 pg/ml e 673 ± 69 pg/mL para indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite respectivamente. Todas as outras citocinas estavam presentes em níveis que variam 39-327 pg/ml. Não houve uma associação entre os níveis de citoci-

nas salivares e parâmetros clínicos da doença periodontal. A diluição dos componentes fluido gengival em saliva parece mascarar diferenças existentes nos níveis destes biomarcadores no nível do sítio.

Petković et al. (2010) consideraram que a análise do fluido crevicular peri-implantar (FCPI) oferece um método não invasivo e que pode ser um dos métodos para se estudar a resposta do hospedeiro na doença peri-implantar, como também pode fornecer uma indicação precoce de pacientes com risco de doença ativa. Neste estudo, os autores examinaram o FCPI e os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e MIP-1 α em pacientes sem manifestação de inflamação, e nos estágios iniciais e tardios da mucosite. O grupo de estudo composto por 90 voluntários, sendo todos adultos saudáveis com implantes. Foram coletadas amostras do FCPI utilizando a técnica com um papel filtro. Tecidos de implantes foram categorizados como clinicamente saudável, mucosite precoce ou mucosite avançada. As manifestações clínicas foram determinadas por: índice gengival e sangramento à sondagem, índice de placa e análises radiográficas. As concentrações de citocinas foram avaliadas pelo método ELISA. Os pacientes do grupo controle (pacientes saudáveis) apresentavam concentrações significativamente mais baixas de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e MIP-1 α em FCPI em comparação com ambos os grupos com a mucosite. Correlação positiva foi observada no grupo controle entre a IL-1 β e TNF- α e entre MIP-1 α e IL-8 no grupo com mucosite precoce. Os resultados sugerem que as citocinas podem ser marcadores para determinar o prognóstico do implante .

Güncü et al. (2012) analisaram componentes do FCPI: IL-1 β , IL-10, osteoprotegerina (OPG), ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante (RANKL) para determinar se os níveis do valor do diagnóstico do FCPI pode ser utilizada para avaliar alterações precoces ao redor dos implantes. Participaram do estudo oito pacientes com média de idade de $48,5 \pm 12,72$ anos, comum total de 47 implantes. Todos os implantes foram colocados pelo menos há 12 meses e carregados pelo menos há 6 meses antes do estudo. Os 47 implantes dentários foram divididos em dois grupos: saudável/não-inflamado ($n = 20$) (Grupo I), ou mucosite/inflamado ($n = 27$) (Grupo II). As condições peri-implantares foram avaliadas clinicamente por meio de índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e índice de sangramento gengival, amostras de FCPI também foram obtidos e os níveis de IL-1 β , IL-10, de RANKL e OPG foram quantificados no FCPI por ensaio imunoenzimático. Também foram avaliadas as mudanças volumétricas potenciais no FCPI. Todos os parâme-

tros clínicos e de volume do FCPI foram maiores no Grupo II e essas diferenças foram estatisticamente significantes, exceto os valores de volume. Os níveis de IL-1 β , IL-10 e OPG no FCPI foram significativamente mais elevados no Grupo II. Embora o nível RANKL no Grupo II foi mais elevado do que o nível do grupo I, a diferença entre os dois grupos não atingiram o nível de significância estatística. Estes dados sugerem que o equilíbrio de moléculas inflamatórias na osteoclastogênese, produzidas localmente podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças e lesões inflamatórias na peri-implantite.

Fonseca et al. (2014) verificaram níveis de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , e TNF- α no FCPI e saliva de vinte e dois pacientes (16 mulheres e 06 homens, com idade média de 62,5 anos, desdentados totais e usavam prótese fixa mandibular protocolo Branemark), suportado por cinco implantes com plataforma regular hexágono externo durante pelo menos 6 meses, esses pacientes foram divididos em dois grupos, mucosite e peri-implantite. As amostras de pacientes com doença peri-implantar foram avaliadas por meio de imunoensaio (Multiplex), observaram que a quantidade total de IL-1 β no FCPI foi significativamente maior em áreas com peri-implantite em relação a mucosite e parece ser um traço característico de pacientes com peri-implantite, independentemente do grau de destruição. A saliva do ducto da parótida mostrou um aumento significativo da expressão de IL-8, o qual poderia estar relacionado com uma resposta sistêmica.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de biomarcadores (IL-1 β , IL-4, MIP-1 β , TNF- α) na saliva de pacientes portadores de peri-implantite e saudáveis.

Determinar se esses biomarcadores podem ser utilizados como método auxiliar de diagnóstico da doença peri-implantar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo transversal foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Guarulhos (CEP UnG 113-2008). O protocolo do estudo foi explicado a cada indivíduo e posteriormente assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os dados referentes aos pacientes com e sem peri-implantite foram descritos no estudo de Shibli et al. (2008).

Foram coletadas amostras de saliva de cinquenta e dois (52) indivíduos com média de idade $48,9 \pm 13,5$ anos, com implantes dentários em função há 2 anos.

Os indivíduos foram divididos em 3 grupos:

- grupo saudável $n=21$ indivíduos com pelo menos 1 implante saudável (nPimp)
- grupo com peri-implantite $n=21$ indivíduos com pelo 1 implante com peri-implantite (Pimp)
- grupo desdentados com $n=10$ indivíduos desdentados totais (Des)

A peri-implantite foi caracterizada por perda óssea em forma de taça, reabsorção óssea maior do que 3mm, inflamação da mucosa peri-implantar exibindo sangramento à sondagem e/ou supuração (MOBELLI, 1999).

3.1 Critério de exclusão

Os indivíduos foram excluídos se tivessem um implante com uma superfície tratada, periodontite crônica moderada a severa (ex. supuração, sangramento à sondagem em mais de 30% dos sítios subgengivais ou qualquer sítio com profundidade de sondagem ≥ 5 mm), ter feito uso antibióticos ou anti-inflamatórios e se haviam recebido terapia periodontal ou peri-implantar 6 meses antes da análise clínica, ter uma doença ou condição médica crônica, apresentado próteses implanto-suportadas com pilares soltos e/ou parafusos, fratura das coroas protéticas de cerâmica ou resina (para evitar interferência oclusal), mobilidade clinicamente detectável do implante (perda de osseointegração) e se eles eram fumantes.

3.2 Avaliação clínica dos implantes

Foram avaliados 42 implantes (1 por indivíduo), caso o indivíduo tivesse mais de um implante saudável foi escolhido o mais anterior. Para inclusão do grupo teste (peri-implantite), estes deveriam apresentar somente 1 implante com a doença. Caso o indivíduo apresentasse 1 implante saudável e 1 com peri-implantite ele foi colocado no grupo teste.

3.3 Exame clínico e radiográfico

Os parâmetros clínicos como Índice de placa (IP), Índice gengival (IG), sangramento à sondagem (SS), supuração (SUP) foram coletados na forma dicotômica, e as medidas de profundidade de sondagem (PS) e perda de inserção clínico (PIC), foram determinada em 6 sítios por implante (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mésio-lingual). As medições de profundidade de sondagem e o nível clínico de inserção foram registrados em milímetros, utilizando uma sonda periodontal Carolina do Norte (PCPNU-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA).

Foram obtidas radiografias periapicais intra-orais padronizadas, utilizando um aparelho de raio-X odontológico equipado com um cone de 35 cm de comprimento. Os parâmetros de exposição foram de 70 quilovolts (pico), 15 mA, e ¼ segundo a uma distância do foco para o sensor de 30 cm. O exame radiográfico foi utilizado como método auxiliar de diagnóstico da perda óssea.

3.4 Coleta de saliva

Amostras de saliva foram coletadas na clínica, previamente ao exame dentário, não houve ingestão de alimentos ou líquidos antes da realização da coleta das amostras.

A quantidade mínima de saliva coletada para cada paciente foi de 5ml, colocados em um tubo de coleta previamente marcado. As amostras foram transferidas

para tubos de 50ml, após a coleta e transferidas para os tubos de análises as amostras foram congeladas a -20 C°.

3.5 Análise das citocinas pelo método MULTIPLEX

A Tecnologia Luminex™ xMAP (MAP=*Multiple Analyte Profiling*, x= sua variável (ex: citocinas, endócrino, oligo) envolveu um processo exclusivo que cora microesferas de látex com dois fluoróforos. Utilizando proporções precisas de dois fluoróforos podem ser criados 100 conjuntos diferentes de microesferas, cada uma delas com uma assinatura baseada em “código de cores” e que podem ser identificadas pelo instrumento Luminex.

Os kits Milliplex foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados as microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado por meio de microesferas. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera. A leitura dos resultados foi realizada no Equipamento MagPix - Software xPonent/Analyst versão 4.2. Para a análise das citocinas foi utilizado o kit Cat # HCYTO60K-08 (IL-1 β , IL-4, MIP-1 β e TNF- α) - Lote: 2346690 - Exp. em 30/09/2014-Millipore.

3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0 for Mac Os X (San Diego, CA, USA).

Os parâmetros clínicos, e os marcadores na saliva foram computados por item e por indivíduo de ambos os grupos.

Para os dados clínicos e salivares, primeiramente foram testados a normalidade pelo Teste de normalidade – Kolmogorov-Smirnov. As amostras que apresentavam normalidade foram aplicadas o teste de *t student*, e no caso de não apresentarem normalidade foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A Idade e profundidade à sondagem o teste *t student* foi utilizado. Para os parâmetros de Índice de Placa, Índice Gengival, Sangramento a sondagem (dados dicotômicos) o teste Mann Whitney foi aplicado. O nível de significância foi fixado em 5%.

4 RESULTADOS

O grupo desdentado (Des) foi utilizado como grupo controle para a comparação dos outros dois grupos (grupo controle negativo).

Portanto dos parâmetros clínicos, somente a idade foi comparada entre os três grupos (Pimp, nPimp e Des), foi encontrada diferença significativa entre o grupo nPimp ($49,0 \pm 12,2$) com o grupo Des ($62,2 \pm 12,45$) $p=0,0137$ (Tabela 2).

PS foi comparada entre os grupos Pimp, nPimp utilizando o teste t student, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado Pimp ($5,06 \pm 2,28$) vs nPimp ($3,27 \pm 0,99$) $p=0,0050$.

O IP, IG e SS foram comparados entre os grupos Pimp, nPimp, utilizando o teste Mann Whitney onde IP não apresentou diferenças significantes entre os grupos, entretanto o IG obteve diferença significativa quando comparado Pimp ($53,9 \pm 36,1$) vs nPimp ($26,5 \pm 35,3$) $p=0,0227$. O SS também apresentou diferença entre os grupos Pimp ($80,8 \pm 30,8$) vs nPimp ($50,0 \pm 36,4$) $p=0,0089$ (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos dados clínicos dos pacientes

	Pimp	nPimp	Des	Pimp vs nPimp	Pimp vs Des	nPimp vs Des
Idade	$52,6 \pm 12,1$	$49,0 \pm 12,2$	$62,2 \pm 12,45$	0,3778	0,0537	0,0137*
IP (%)	$31,7 \pm 40,1$	$43,1 \pm 43,7$	-	0,5058	-	-
IG (%)	$53,9 \pm 36,1$	$26,5 \pm 35,3$	-	0,0227*	-	-
PS mm	$5,06 \pm 2,28$	$3,27 \pm 0,99$	-	0,0050*	-	-
PIC	$5,08 \pm 2,03$	$0,15 \pm 0,64$	-	<0,0001*	-	-
SS (%)	$80,8 \pm 30,8$	$50,0 \pm 36,4$	-	0,0089*	-	-
SUP	$10,7 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	-	<0,01*	-	-

Idade e PS (Teste *t student*); IP, IG,SS, SUP (Teste Mann Whitney)

4.1 Resultados da quantificação de citocinas pelo método do Multiplex

Os níveis médios dos biomarcadores foram inicialmente comparados entre os grupos Pimp, nPimp e Des utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados mostraram que quantidade de IL-1 β na saliva obteve significância somente quando comparada entre os grupos Pimp ($5,31 \pm 13,20$ pg/ml) vs Des ($3,74 \pm 2,27$ pg/ml) (Figura 2 e Tabela 3), já a IL-4 não apresentou significância quando comparada entre os 3 grupos (Figura 3 e Tabela 3). O biomarcador MIP-1 β obteve significância quando comparado os grupos Pimp ($2,67 \pm 2,43$) x Des ($7,32 \pm 4,45$) e nPimp ($3,53 \pm 2,82$) x Des ($7,32 \pm 4,45$) e não foi significativo quando comparado Pimp ($2,67 \pm 2,43$) x nPimp ($3,53 \pm 2,82$) (Figura 4 e Tabela 3). O biomarcador TNF- α seguiu o mesmo padrão do MIP-1 β tendo significância quando comparado os grupos Pimp ($1,02 \pm 0,86$) x Des ($8,32 \pm 5,46$) e nPimp ($1,64 \pm 1,86$) x Des ($8,32 \pm 5,46$) e não foi significativa quando comparado Pimp ($1,02 \pm 0,86$) x nPimp ($1,64 \pm 1,86$) (Figura 5 e Tabela 3). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados das citocinas em pg/ml (média e DP)

	Pimp	nPimp	Des	Pimp vs nPimp	Pimp vs Des	nPimp vs Des
IL-1 β	$5,31 \pm 13,20$	$1,87 \pm 2,01$	$3,74 \pm 2,27$	ns	*	ns
IL- 4	$0,0026 \pm 0,0045$	$0,0173 \pm 0,0369$	$0,0244 \pm 0,0430$	ns	ns	ns
MIP-1 β	$2,67 \pm 2,43$	$3,53 \pm 2,82$	$7,32 \pm 4,45$	ns	**	*
TNF- α	$1,02 \pm 0,86$	$1,64 \pm 1,86$	$8,32 \pm 5,46$	ns	***	***

ns= não significante Kruskal-Wallis (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** $p < 0,002$)

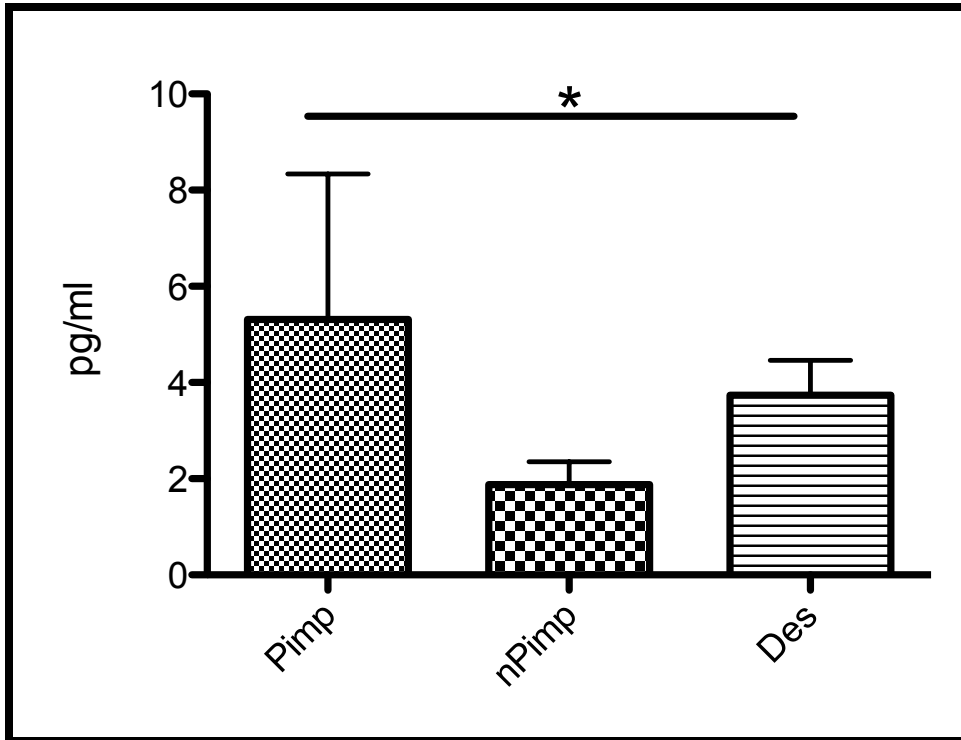


Figura 2. Gráfico apresentando valores de IL-1 β nos grupos estudados. *=p<0,05

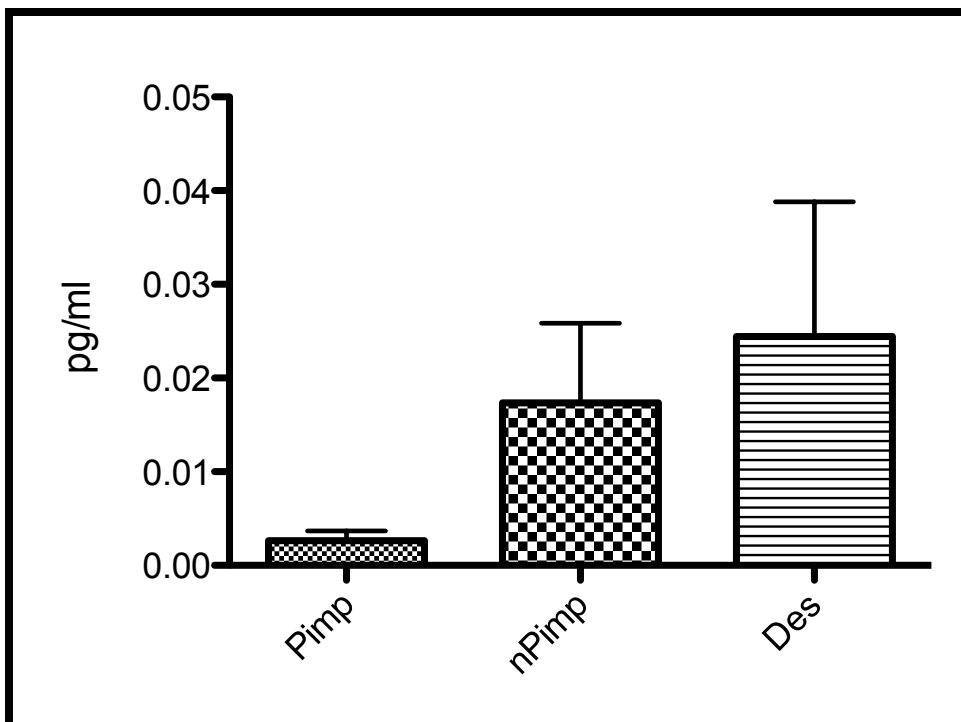


Figura 3. Gráfico apresentando valores de IL-4 nos grupos estudados.

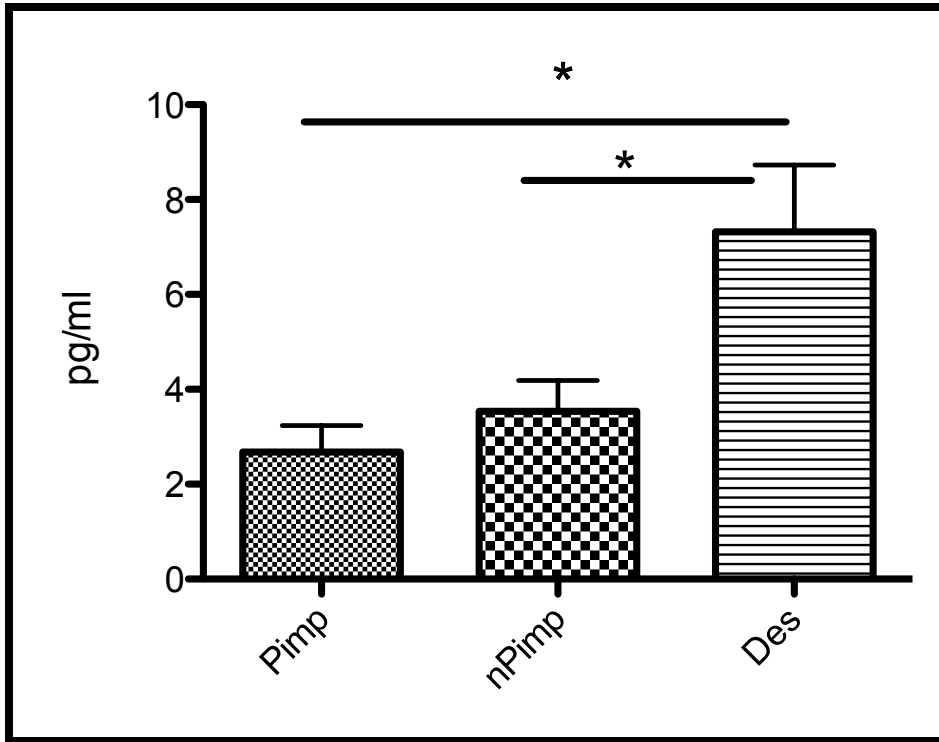


Figura 4. Gráfico apresentando valores de MIP-1 β nos grupos estudados. *=p<0,05

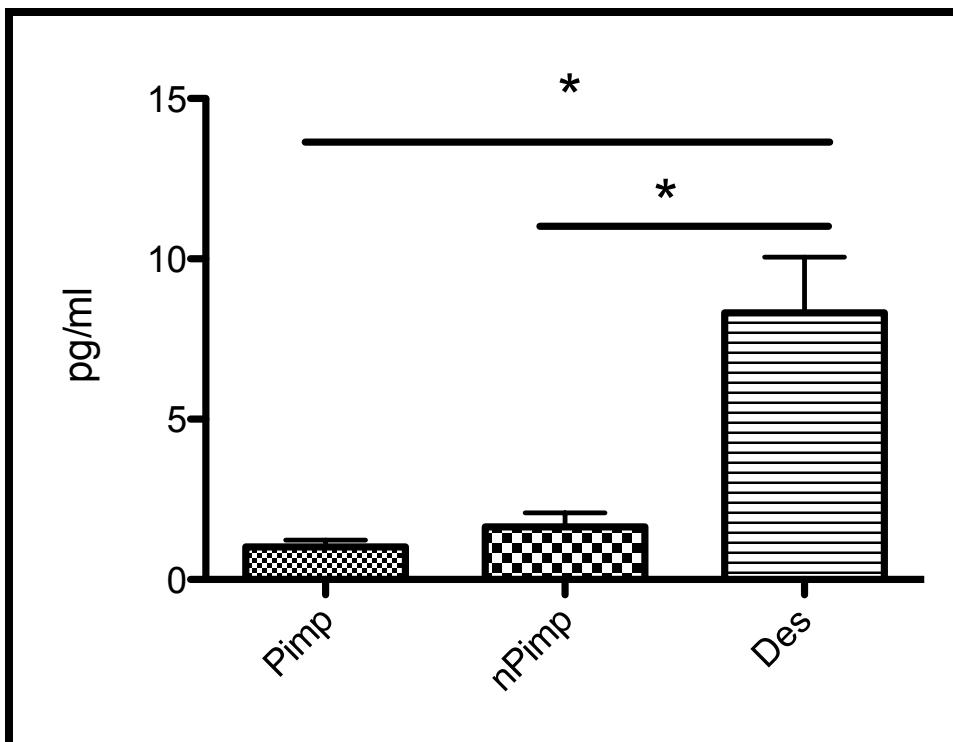


Figura 5. Gráfico apresentando valores de TNF- α nos grupos estudados. *=p<0,05

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os níveis de biomarcadores como IL-1 β , IL-4, TNF α e MIP-1 β na saliva de pacientes saudáveis e com peri-implantite e em pacientes desdentados.

Levando em consideração que a periodontite e a peri-implantite apresentam características semelhantes em manifestação clínica e perfil de agente patogênico (biofilme dental) (PANAGAKOS et al. 1996), e o FGC e o FCPI apresentam semelhanças em sua composição (JAVED et al. 2011), e devido a dificuldade de se encontrar trabalhos de peri-implantite associadas a esses biomarcadores utilizamos trabalhos com ambas as doenças e amostras tanto no fluido e/ou saliva.

Na análise dos parâmetros clínicos onde foi comparado o grupos Pimp vs nPimp os dados referente a IG, PS, PIC, SS, SUP obteve significância estatística devido as diferenças características da doença peri-implantar (ALBREKTSSON & ISIDOR, 1994; MOMBELLI, 1999; HEITZ-MAYFIELD, 2008; ZITZMANN & BERGLUNDH, 2008).

O grupo de desdentado foi utilizado como controle negativo. O paciente não apresentava nenhum nicho dentário ou implantar, sem fator de retenção de biofilme dentário/implantar. Quando aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov foi encontrado normalidade nos biomarcadores estudados representado o mesmo padrão do biomarcador nestes pacientes. Outro ponto interessante é que não encontramos trabalhos publicados sobre biomarcadores com grupo de desdentados, o que tornou mais difícil a comparação dos resultados encontrados para esse grupo.

Na comparação entre os grupos Pimp e nPimp, os resultados do imunoensaio multiplex revelaram que a citocina mais abundante na saliva foi a IL-1 β (5,31 $\pm$ 13,20), esse resultado está de acordo com relatos de outros pesquisadores que descreveram elevados níveis deste biomarcador, tais como a IL-1 β em indivíduos com periodontite e peri-implantite em comparação com indivíduos saudáveis (KAO et al. 1995; PANAGAKOS et al. 1996; SALCETI et al. 1997; PETKOVIĆ et al. 2010; GÜNCÜ et al. 2012; FONSECA et al. 2012). No presente estudo, embora as amostras foram analisadas na saliva e não no FGC e FCPI como trabalhos de Kao et al. (1995), Panagakos et al. (1996), Salcetti et al. (1997), PETKOVIĆ et al. (2010), GÜNCÜ et al. (2012), Fonseca et al. (2012), os níveis de IL-1 β em saliva de pacientes eram mais elevados em pacientes com peri-implantite em relação aos saudáveis,

porém não apresentou significância. Este achado sugere que níveis elevados de IL-1 β pode ser apontado como um fator importante para a manifestação clínica da doença peri-implantar.

Embora a expressão da citocina IL-1 β não foi significativa no presente estudo, esta não pode ser utilizada como método para diagnosticar a doença peri-implantar.

Os resultados não demonstraram diferenças significativas nos níveis das citocinas analisadas entre pacientes com peri-implantite, saudáveis. Porém quando comparados com o grupo de desdentados apresentou diferença significativa em quase todos os biomarcadores com exceção da IL-4.

Em relação à expressão de citocinas Th2, nosso estudo mostrou que a IL-4 não obteve significância. Apesar de que numericamente foi encontrada a proporção de seis vezes mais IL-4 nos pacientes saudáveis. Nos estudos de Duarte et al. (2009), Fonseca et al. (2014) a IL-4 apresentou uma tendência a ser mais elevada em sítios rasos de pacientes com peri-implantite em comparação com sítios profundos, isso demonstrado por técnicas diferentes, o estudo de Duarte et al. (2009) foi realizado por meio de biópsia e reação em cadeia da polimerase (PCR) e de Fonseca et al. (2014) realizado em FCPI. A presença deste biomarcador de Th2, com características anti-inflamatórias pode explicar a ausência de progressão da doença nesses sítios, uma vez que a resposta imune do hospedeiro é regulada pelo balanço de pro e anti-inflamatórias (ZANATA et al. 2009; FONSECA et al, 2014).

O resultado referente ao biomarcador MIP-1 β não apresentou significância entre os grupos Pimp vs nPimp, mas apresentou diferença significativa entre o grupo Des e os demais. Os resultados obtidos por Emingil et al. (2005) onde constataram que o biomarcador MIP-1 β foi significativamente inferior quando comparado aos grupos que apresentavam graus diferentes de periodontite em relação aos saudáveis no FGC e de Kabashima et al. (2002) que também constataram aumento desse biomarcador de acordo com a progressão da doença por estudo imunohistoquímico.

Nos resultados para TNF- α não foi encontrado significância estatísticas entre os grupos Pimp vs nPimp, dados similares foram encontrados por Fonseca et al. (2014), que também não encontraram significância entre os grupos de peri-implantite e mucosite, porém nos resultados encontrados por Duarte et al. (2009), apresentaram uma tendência a ser mais elevado em peri-impantite avançada, seguido de peri-implantite inicial e mucosite respectivamente já Petković et al. (2010) encontrou níveis elevados de TNF- α em mucosite em relação a paciente saudáveis.

O único estudo realizado em saliva pela técnica multiplex para quantificar biomarcadores inflamatórios em doenças peri-implatares foi o de Fonseca et al. (2014). Os autores comparam amostras salivares e de FCPI em pacientes com mucosite e peri-implantite, seus resultados também não apresentaram diferenças significantes em nenhum biomarcador inflamatório na saliva.

A diferença estatística referente ao grupo Des onde há uma prevalência maior a lesões orais causadas muitas das vezes por próteses mal adaptadas, sendo as mais frequentes hiperplasias, as estomatites, úlceras traumáticas e as candidoses (NEVILLE, 2004).

Diferenças nos métodos de coleta de saliva (estimulada ou não estimulada), FCPI e do FGC, processamento (velocidade e tempo de centrifugação), armazenamento (tempo, temperatura e adição ou não de inibidores de proteases) e na metodologia utilizada para a quantificação dos biomarcadores (ELISA, Luminex, imunohistoquímica) também pode ter tido um impacto sobre a diferença no resultado (BROWNE et al. 2013)

O fluido crevicular peri-implantar (FCPI) é um exsudato inflamatório osmoticamente mediado, proveniente dos vasos do plexo gengival. A sua composição é semelhante à do FGC que contém as enzimas, mediadores inflamatórios e produtos de degradação de tecidos (JAVED et al. 2011), e a diluição na saliva pode mascarar diferenças existentes nos níveis destes biomarcadores .

Após a análise desses biomarcadores não foi encontrado diferença estatística. No estudo de Fonseca et al. (2012) também não foi encontrado diferenças significativas nos biomarcadores estudados quando a quantificação do Multiplex foi feita na saliva de pacientes com mucosite e peri-implantite, os resultados de Teles et al. (2009) também não demonstraram diferença significativa nos níveis das citocinas avaliadas entre pacientes com periodontite crônica e indivíduos adultos saudáveis, alegando que a diluição dos componentes do fluido gengival na saliva parece mascarar as diferenças existentes nos níveis destes biomarcadores a nível local.

6 CONCLUSÃO

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão dos biomarcadores IL-1 β , IL-4, MIP-1 β e TNF- α na saliva entre os pacientes com implantes saudáveis e pacientes com peri-implantite, e com base nos resultados deste estudo os biomarcadores analisados não podem ser utilizados como método auxiliar de diagnóstico da doença peri-implantar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBREKTSSON, T. & ISIDOR, F. Consensus report: implant therapy. In: Lang, N.P. & Karring, T. eds. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*, Berlin: Quintessence, p. 365–369, 1994.
- BERGLUNDH, T.; PERSSON, L.; KLINGE, B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. **J Clin Periodontol**, v. 29 Suppl 3, p. 197-212; discussion 232-3, 2002.
- BRANEMARK, P. I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.
- BROWNE, R. W. et al. Performance of multiplex cytokine assays in serum and saliva among community-dwelling postmenopausal women. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e59498, 2013.
- DUARTE, P. M. et al. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 5, p. 514-20, May 2009.
- EMINGIL, G. et al. Gingival crevicular fluid EMAP-II, MIP-1alpha and MIP-1beta levels of patients with periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 8, p. 880-5, Aug 2005.
- FONSECA, F. J. et al. Cytokines expression in saliva and peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant disease. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 2, p. e68-72, Feb 2014.
- GÜNCÜ, G. N. et al. Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 313-6, Aug 2012.
- HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 5, p. 559-64, Nov 1994.
- HEITZ-MAYFIELD, L. J. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 292-304, Sep 2008.
- JAVED, F. et al. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Cytokine**, v. 53, n. 1, p. 8-12, Jan 2011.
- KABASHIMA, H. et al. The Presence of Chemokine (Mcp-1, Mip-1 α , Mip-1 β , Ip-10, Rantes)-Positive Cells and Chemokine Receptor (Ccr5, Cxcr3)-Positive Cells in Inflamed Human Gingival Tissues. **Cytokine**, v. 20, n. 2, p. 70-77, 2002.
- KAO, R. T. et al. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 10, n. 6, p. 696-701, Nov-Dec 1995.

KORNMAN, K. S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 1, p. 72-7, Jan 1997.

KREUTZ, M. et al. Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. **Res Immunol**, v. 143, n. 1, p. 107-15, Jan 1992.

LISKMANN, S. et al. Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 21, n. 4, p. 543-50, Jul-Aug 2006.

LOPEZ CARRICHES, C.; MARTINEZ GONZALEZ, J. M.; DONADO RODRIGUEZ, M. Variations of interleukin-6 after surgical removal of lower third molars. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, n. 6, p. E520-6, Nov-Dec 2006.

MACHTEI, E. E.; OVIED-PELEG, E.; PELED, M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implant platforms. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 6, p. 658-65, Dec 2006.

MOMBELLI, A. Prevention and therapy of periimplant infections. In: Lang, N.P., Karring, T. & Lindhe, J. Eds. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology*. Quintessence Books, Berlin. p. 281–303, 1999.

MOMBELLI, A.; MULLER, N.; CIONCA, N. The epidemiology of peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 6, p. 67-76, Oct 2012.

MONTES, C. C. et al. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 2, p. 208-17, Feb 2009.

MURATA, M. et al. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res**, v. 13, n. 6, p. 637-43, Dec 2002.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.N.; BOUQUOT, J.E. *Patologia oral e maxilo-facial*. 2ª. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

OPPENHEIM, J. J. Cytokines: past, present, and future. **Int J Hematol**, v. 74, n. 1, p. 3-8, Jul 2001.

PANAGAKOS, F. S. et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, n. 6, p. 794-9, Nov-Dec 1996.

PETKOVIC, A. B. et al. Proinflammatory cytokines (IL-1beta and TNF-alpha) and chemokines (IL-8 and MIP-1alpha) as markers of peri-implant tissue condition. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 5, p. 478-85, May 2010.

PONTORIERO, R. et al. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. **Clin Oral Implants Res**, v. 5, n. 4, p. 254-9, Dec 1994.

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 2, p. 140-7, Feb 2013.

SALCETTI, J. M. et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 12, n. 1, p. 32-42, Jan-Feb 1997.

SHIBLI, J. A. et al. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 10, p. 975-82, Oct 2008.

STASHENKO, P. et al. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 18, n. 7, p. 548-54, Aug 1991.

TELES, R. P. et al. Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. **J Periodontal Res**, v. 44, n. 3, p. 411-7, Jun 2009.

ZANATTA F. B. Et al. A Participação Das Células T Helper Na Periodontite Crônica. **Rev Periodontia**, v. 19 (2), p. 7-13, Jun 2009.

ZITZMANN, N. U.; BERGLUNDH, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 286-91, Sep 2008.