

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Mestrado
Concentração: Implantodontia

JAIME SIMÃO MARQUES FILHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-2, IL-6, MCP-1 E MIP-1 α NA
SALIVA DE PACIENTES COM PERIIMPLANTITE**

SÃO PAULO
2014

JAIME SIMÃO MARQUES FILHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-2, IL-6, MCP-1 E MIP-1 α NA
SALIVA DE PACIENTES COM PERI-IMPLANTITE**

**“Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Odontologia – Área de concentração
Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade de Santo Amaro, sob a
orientação do Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz
Filho e co-orientadora Prof^a. Dr^a. Debora Pallos.”**

**São Paulo
2014**

RESUMO

A doença peri-implantar é uma inflamação crônica ao redor de implantes causada por infecção bacteriana. A liberação de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias está associada com a progressão da doença. Este estudo teve como objetivo medir os níveis de IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α na saliva de pacientes com doença peri-implantar. Quarenta e dois indivíduos (idade média de 48,9 anos, 13-51 anos), apresentando implantes em função por pelo menos 2 anos, foram incluídos neste estudo. As amostras foram divididas em dois grupos (n=21): um grupo controle contendo 21 pacientes com pelo menos um implante dentário saudável e um grupo com peri-implantite tendo 21 indivíduos com pelo menos um implante doente. Peri-implantite caracterizou-se por defeito ósseo maior de 3 mm e inflamação com sangramento à sondagem e/ou supuração. Os parâmetros clínicos avaliados foram índice de placa, sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção. Amostras de saliva estimulada foram coletadas e a expressão das citocinas foi obtida por imunoensaio multiplex. Nível elevado de IL-6 foi observado nas amostras do grupo com peri-implantite, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa. Como conclusão não foram encontradas diferenças significantes na expressão das citocinas IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α na saliva entre os pacientes com implantes saudáveis e doentes.

ABSTRACT

The **peri-implantitis disease** is a chronic inflammation around implants caused by bacterial infection. The release of pro-inflammatory **cytokines** and chemokines is associated with the progression of the disease. This study aimed to measure levels of IL - 2, IL - 6 , MCP - 1 and MIP- 1 α in the saliva of patients with **peri-implant disease**.

Forty-two subjects (mean age 48.9 years , 13-51 years), with implants in function for at least 2 years were included in this study. The samples were divided into two groups (n = 21): a control group containing 21 patients with at least one healthy dental implant and a group of peri-implantitis comprising for 21 individuals with at least one diseased implant. Peri-implantitis is characterized by greater bone defect of 3 mm and inflammation with bleeding on probing and/or suppuration. The clinical parameters evaluated were plaque index, gingival bleeding, bleeding on probing, suppuration, probing depth and clinical attachment level. Stimulated saliva samples were collected, and cytokine expression was determined by multiplex immunoassay. High level of IL - 6 were observed in samples from the group with peri-implantitis, however there was no statistically significant difference between. In conclusion, no significant differences were found in the expression of **cytokines**, IL - 2, IL - 6 , MCP - 1 and MIP- 1 α in the saliva among patients with healthy and diseased implants .

SUMÁRIO

RESUMO.....	03
ABSTRACT.....	04
LISTA DE ABREVIATURAS.....	06
1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OBJETIVO.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1-Critérios de Exclusão.....	30
4.2-Calibração.....	30
4.3-Seleção do Implante.....	31
4.4-Exame clínico e radiográfico.....	31
4.5-Coleta de saliva.....	32
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÃO.....	
REFERÊNCIAS.....	

LISTA DE ABREVIATURAS

BOP (*bleeding on probing*) - Sangramento gengival na sondagem.

CAL - Nível clínico de inserção.

HC - Paciente periodontalmente saudável como controle.

HC-1 - Tecido gengival e periodontal saudável da margem gengival distal do segundo molar obtidos durante exodontia de terceiros molares impactados.

HC-2 - Tecido gengival e periodontal saudável da papila interdental do pré-molar extraído do paciente periodontalmente saudável.

HC-3 - Tecido gengival com saúde periodontal de pacientes que foram submetidos ao aumento de coroa clínica.

GAP - Periodontite agressiva generalizada.

GCF - Fluido crevicular gengival.

GM-CSF - Fator estimulante de colonização de granulócitos-macrófagos.

GI - Índice gengival.

IL - Interleucina.

IL-1 β - Interleucina-1 beta.

IL-2 - Interleucina-2.

IFN- γ - Interferon-gama.

IL-10 - Interleucina-10.

IL-13 - Interleucina-13.

IL-6 - Interleucina-6.

MCP-1 - Proteínas quimiotáticas de macrófagos – 1.

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos.

MMP - Matriz de metaloproteinases.

NIC - Não-agrupados.

OPG – Osteoprotegerina.

PAI-2 - Sistemas de ativador de plasminogênio "inibidor -2".

PD - Profundidade de sondagem.

PGE2 - Prostaglandina E2.

PC - Periodontite crônica.

PCR (*polymerase chain reaction*) - Reação em cadeia da polimerase.

PI - Peri-implantite.

PICF - Fluido crevicular peri- implante.

RANKL - Ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante.

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa.

TGF- β 1 - Fator de crescimento transformante beta-1.

1.INTRODUÇÃO

Os implantes dentários têm inovado cada vez mais a Odontologia reabilitadora. O uso de implantes osseointegráveis tornou-se um procedimento comum em substituição a dentes perdidos. Em 1970 a expectativa de vida dos homens e mulheres em nosso país era de 53,5 anos, já em 2011 esse número passou para 74,1 anos. Devido a esse aumento, hoje nossos pacientes procuram melhor qualidade de vida inclusive no que diz respeito a sua saúde bucal (IBGE, 1995). Branemark *et al.* (1985) (BRANEMARK *et al.*, 1969) define a osseointegração como uma conexão estrutural e funcional direta entre a disposição do osso existente e a superfície do implante, sem a interposição de tecido fibroso. Já Albrektsson *et al.* (1986) (ALBREKTSSON; JANSSON; LEKHOLM, 1986) caracterizaram a osseointegração como uma conexão direta entre osso vivo e a superfície de um implante submetido à carga funcional. Atualmente, os implantes de titânio são muito utilizados na clínica odontológica, oferecendo excelentes resultados estéticos e funcionais (BECKER *et al.*, 1999; LAINE *et al.*, 2006). Contudo, os tecidos que suportam o implante osseointegrado são susceptíveis a patologias, que podem levar à perda do implante (COX; ZARB, 1987).

Patologias peri-implantares foram descritas no Primeiro Workshop Europeu em Periodontia. Albrektsson *et al.* (1994) (F., 1994) definiram a doença peri-implantar, como uma inflamação crônica em torno dos implantes causada por infecção de bactérias, podendo ser classificada em duas entidades: mucosite (MU) e periimplantite (PI) (JAVED, FAWAD *et al.*, 2007). MU é uma inflamação reversível relacionada com tecidos moles que, quando removido o agente agressor retorna ao estado saudável sem perda de estrutura, enquanto que a PI é uma resposta inflamatória irreversível que conduz a perda óssea alveolar, provocando o colapso do implante, de estruturas de apoio e pode causar a perda do mesmo. (CIRANO *et al.* 2007) (TOGASHI *et al.*, 2007).

A relação entre periodontite crônica severa e peri-implantite foi identificada (Aloufi *et al.* 2009) (ALOUFI *et al.*, 2009). Dados recentes também sugeriram que peri-implantite é uma infecção anaeróbica polimicrobiana (CHARALAMPAKIS *et al.* 2012) (CHARALAMPAKIS *et al.*, 2012). A suscetibilidade infecciosa é o fator

primordial da peri-implantite. Desta forma, parece lógico que a presença da periodontite na história regressa está ligada ao aumento de risco de peri-implantite. Indivíduos com mais de 65 anos de idade, portadores de periodontite ativa, ou portadores de edentulismo também parece ter alto risco de desenvolver peri-implantite (MARRONE *et al.* 2013) (MARRONE *et al.*, 2013).

A placa bacteriana gera produtos (lipopolisacarídeos e endotoxinas) que causam resposta inflamatória. A partir disso, temos a liberação de citocinas inflamatórias que estão relacionadas com a perda óssea ao redor do implante (MASASHI *et al.*, 2002; OKADA; MURAKAMI, 1998). O lançamento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b ,IL-6 ,IL-8 e TNF-a) na saliva esta fortemente associado com a sua capacidade de reabsorver osso ao redor do implante (KREUTZ *et al.*, 1992). Foi detectado um nível mais alto de citocinas pró inflamatórias em sulcos com PI quando comparado com MU (PANAGAKOS *et al.*, 1996).

Atualmente, um dos desafios dos implantodontistas é o controle da PI. Pesquisadores e clínicos têm buscado meios de prevenção e tratamento da doença, acompanhando os indicadores de risco, realizando procedimentos preventivos e testando variações dos protocolos de tratamento. As lesões peri-implantares são geralmente assintomáticas e na maioria das vezes, detectadas em consultas de manutenção. Elas são resultado de um desequilíbrio entre a ação das bactérias e a resposta inflamatória do organismo hospedeiro. A etiologia dessas patologias é multifatorial e está relacionada, principalmente, com: higiene oral deficiente, histórico de doença periodontal, fumo, diabetes e álcool. Entretanto, relatos mais atuais da literatura têm demonstrado que o tipo de implante pode também influenciar no aparecimento destas lesões. Materiais, propriedades de superfície, desenho do implante, tempo em função e tipo de prótese podem ser fatores contribuintes para esta perda óssea (FRANSSON *et al.*, 2009; KARBACH *et al.*, 2009).

A inflamação é parte do processo fisiológico que visa reparar o dano tecidual causado por infecção, trauma ou autoimunidade. Quando este processo fisiológico encontra-se alterado, pode contribuir para o aumento do dano tecidual. As quimiocinas e citocinas são importantes elementos envolvidos no processo de migração celular para os tecidos inflamados (VARELLA *et al.* 2011) (VARELLA *et al.*, 2011). Para TELES *et al.* (2010) (R.P. TELES, 2010) as doenças periodontais resultam de interações entre específicas espécies microbianas subgengivais e muito

pouco se sabe sobre o impacto da composição do biofilme subgengival na secreção de biomarcadores pelos tecidos periodontais adjacentes.

As quimiocinas e citocinas são proteínas que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Suas funções primordiais são direcionar as células do sistema imune para os sítios de inflamação no organismo. Atuam em concentrações baixíssimas e suas sínteses habitualmente ocorrem após estimulação antígena. Neste estudo trabalhamos com as quimiocinas MCP1, MIP1a e citocinas IL-2, IL-6 (GONÇALVES et al., 2007).

Ja foi relatado que mediadores inflamatórios são liberados pelas células no periodonto inflamado durante a periodontite, e estes incluem a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . (RATHNAYAKE et al., 2013) IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada por diferentes células na lesão inflamatória, principalmente por monócitos e/ou macrófagos. IL-6 atua tanto como uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória, capaz de induzir o crescimento e a diferenciação de células B e T, e indução de proteínas na fase aguda. TNF- α desempenha um papel vital como uma citocina pró-inflamatória e imunorreguladora central na patogênese da periodontite. Além disso, a citocina IL-1 é um fator estimulador de colonização de macrófagos granulócitos que leva a reabsorção óssea.

Uma forma de se quantificar citocinas é o Luminex, que é um sistema que realiza diversos testes laboratoriais, medindo simultânea e discretamente as múltiplas reações moleculares na superfície de microesferas a partir de uma única alíquota de amostra. Este teste é utilizado para detectar e quantificar simultaneamente vários analitos alvo em tipos de amostras complexas qualificadas, à base de poliestireno ou esferas magnéticas, com código de cores ou revestidas com anticorpos específicos de analitos, com grânulos que reconhecem diferentes analitos-alvo, os quais são misturados e incubados com a amostra (Manual - Luminex 200 Plataforma Luminex 200 IS Ver 2.3). TELES *et al.* (2010) (R.P. TELES, 2010) descreveram que o Luminex 100™ monitora o espectro das propriedades, distinguindo diferentes analitos, ao medir simultaneamente a quantidade de fluorescência associada à R-ficoeritrina, relatados pela intensidade da fluorescência.

Levando em consideração a importância e a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico da peri-implantite, nos parece de fundamental importância a busca por

exames que possam colaborar e guiar as tomadas de decisões clínicas na implantodontia moderna. Diversos estudos demonstram que a presença de mediadores inflamatórios pode ser detectada na saliva, no entanto a correlação entre a doença peri-implantar e a expressão de citocinas presentes na saliva dos pacientes ainda não está bem definida. Esse estudo busca, portanto, avaliar a expressão de IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α na saliva de pacientes com peri-implantite.

2. OBJETIVO

Tendo em vista as complexidades da patogênese peri-implantar, e a busca por novas estratégias de prevenção e tratamento da PI. O objetivo deste trabalho é quantificar os níveis de IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α ; através do método *Luminex*, avaliando a expressão desses na saliva de pacientes não portadores e portadores de PI.

3. REVISÃO DA LITERATURA

SALCETTI *et al.* (SALCETTI J., 1997) avaliando os níveis de fator inflamatório, mediadores de crescimento e patógenos bacterianos associados com implantes falhos, em comparação com implantes saudáveis, encontraram elevações significativas dos níveis de GCF de PGE_2 , IL-1 β , e PDGF em locais com implante falho em comparação com implantes de controle, saudáveis. Os níveis de fluido crevicular gengival de IL-6 foram detectados nos locais de controle do grupo 2, e no grupo 1 nos locais de falência e locais estáveis. No entanto, estes níveis não foram significativamente diferente entre as três categorias de implantes. Foi observada nos níveis de IL-1 β , com o nível mais elevado entre os locais de falha e locais estáveis nos pacientes do grupo 1 contra os pacientes do grupo 2. Esses níveis também são estatisticamente significativos para os locais de falha versus os locais de controle e para os locais estáveis *versus* os locais controle. Os autores do estudo sugerem que proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) estava presente e a ausência da sua expressão no tecido gengival periodontal saudável sugerem que estas quimiocinas podem ser responsáveis para a modulação do processo de doença infecciosa, tal como a periodontite.

MAURER & VON STEBUT *et al.* (2004) (MAURER; VON STEBUT, 2004) descreveram a estrutura, a síntese, degradação e a função biológica da MIP-1 α . De acordo com a revisão da nomenclatura para quimiocinas são produzidas por muitas células, especialmente macrófagos, células dendríticas, e linfócitos. As proteínas MIP-1 expressas pelos linfócitos e monócitos/macrófagos (M Φ), são mais conhecidas pelos seus efeitos quimiotáticos e pró-inflamatórios, mas também por promover a homeostase. As quimiocinas efectoras M Φ , MIP-1 α e proteína inflamatória de macrófagos beta (MIP-1beta), que são produzidas e secretadas pelos M Φ ativados para atrair outras células pró-inflamatórias, são também cruciais no recrutamento dos próprios M Φ para os locais de inflamação. Os membros da família MIP-1 orquestram respostas do hospedeiro inflamatórias agudas e crônicas em locais de lesão ou infecção, principalmente pelo recrutamento de células pró-inflamatórias. Eles são cruciais para a quimiotaxia das células T, da circulação para o tecido inflamado e, também desempenham um papel importante na regulação da

migração transendotelial de monócitos, células dendríticas e células NK. Os neutrófilos e eosinófilos são menos sensíveis aos efeitos quimiotáticos de MIP-1: MIP-1 α só pode recrutar neutrófilos ativados interferon-gama (IFN- γ). A MIP-1 desempenha um papel fundamental na indução e modulação das respostas inflamatórias, ou seja, no contexto das reações autoimunes e de defesa na resposta do hospedeiro. Além disso, as proteínas MIP-1 também regulam diferentes aspectos da homeostase tecidual.

CAMPOS *et al.* (MAURER; VON STEBUT, 2004) observaram a possível relação entre os polimorfismos de nucleotídeos e falha precoce do implante, tendo em vista que a presença destes polimorfismos de nucleotídeos na região promotora dos genes interleucina-2 (IL-2) e interleucina-6 (IL-6) tem modificado a atividade de transcrição destas citocinas e estão associados com várias doenças. Uma amostra de 74 pacientes não fumantes foi dividida em 2 grupos: grupo teste composto por 34 pacientes (idade média de 49,3 anos) com ≥ 1 implantes que falharam e controle grupo que consiste em 40 pacientes (idade média de 43,8 anos) com ≥ 1 implantes saudáveis. Os resultados indicam que os genes com polimorfismos no IL-2 e IL-6 não estão associados com falha precoce do implante, sugerindo que a presença daqueles polimorfismos de nucleotídeo simples não constitui um fator de risco genético para perda do implante na população estudada.

Em 2006 LISKMANN *et al.* (LISKMANN, 2006) avaliaram a relação entre os parâmetros clínicos e as concentrações da citocina pró-inflamatória IL-6 e da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) na saliva de doentes desdentados totais com overdentures sobre implantes, para avaliar se a estimativa da IL-6 e IL-10 na saliva pode ser uma ferramenta de laboratório útil para detectar alterações anteriores a complicações clínicas graves. Trinta voluntários adultos saudáveis (14 homens e 16 mulheres) com overdentures implanto-suportadas foram recrutados. Os parâmetros bioquímicos e clínicos foram avaliados. Os níveis de IL-6 e IL-10 na saliva, profundidade de sondagem de bolsa (mm), índice gengival (0,1,2, ou 3) e sangramento na sondagem (0 ou 1). O nível de IL-6 na saliva no grupo de doença de peri-implantite foi significativamente elevado em comparação com indivíduos saudáveis. A IL-10 pode ser detectada apenas em saliva de pacientes com doença de peri-implantite, e que não aparecem em quantidades detectáveis na saliva de

controles saudáveis. Além disso, os níveis de IL-6 e IL-10 no grupo de doença de peri-implante foi positivamente correlacionada com os parâmetros clínicos.

Os dados do mesmo estudo indicaram que os elevados níveis de IL-6 e IL-10 foram estatisticamente associados com BOP positivo (*bleeding on probing*, sangramento gengival na sondagem), $GI \geq 1$, e $PPD > 3$ mm. A investigação indicou que os níveis de IL-6 e IL-10 são elevadas na saliva de pacientes com doença periimplantar, em comparação com pacientes saudáveis. Os resultados também sugerem que a IL-6 e IL-10 podiam ser utilizados como marcadores de doença peri-implante em conjunto e que o nível desta última citocina proporciona informação adicional sobre a potência da resposta imunitária integrada de um organismo para a manutenção do equilíbrio inflamatória.

Em 2008 HEITZ-MAYFIELD *et al.* (HEITZ-MAYFIELD, 2008) realizou uma pesquisa bibliográfica no banco de dados Medline, até 21 de janeiro de 2008 através de uma abordagem sistemática, a fim de rever as evidências para diagnóstico e os indicadores de risco para doença peri-implante. Os estudos experimentais e clínicos têm identificado vários critérios de diagnóstico incluindo parâmetros de sondagem, a avaliação radiográfica e análises de fluido crevicular 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 implante de superfície. Há evidências de que a sondagem usando uma força de luz (0,25 N) não danifica os tecidos do peri-implante e que o sangramento à sondagem (SS) indica a presença de inflamação na mucosa peri-implantar. A profundidade de sondagem, a presença de BOP, e supuração deveria ser avaliadas regularmente para o diagnóstico de doenças peri-implante. As radiografias são necessárias para avaliar os níveis de apoio 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. Revisões sistemáticas indicaram que os indivíduos com história de periodontite estão em maior risco de doença peri-implantar. Diabetes é uma doença sistêmica que resulta em uma grande variedade de mecanismos que pode atrasar a cicatrização de feridas e aumentar a susceptibilidade de um paciente para perda de implante por infecção.

Embora a associação entre diabetes e perda do implante tenha sido abordada em revisões sistemáticas por Kotsovilis *et al.* (2006) (KOTSOVILIS; KAROUSSIS; FOURMOUSIS, 2006) e Mombelli & Cionca *et al.* (2006) (MOMBELLI; CIONCA, 2006), existe apenas um estudo. Futuros estudos prospectivos são necessários para confirmar esses fatores como fatores de risco verdadeiros.

Foi realizado 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 T auxiliares ou T helper 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. Portanto, ZANATTA *et al.* (2009) (ZANATTA FB, 2009) acham que permanece incerto se há uma polarização de resposta T helper na periodontite crônica, sendo necessária a elaboração de mais estudos para que se obtenha respostas claras sobre esta questão.

PETKOVIC *et al.* (2010) (PETKOVIC et al., 2010) consideraram que análise do fluido crevicular peri-implante (PICF) oferece um método não invasivo e que pode ser um dos meios 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 PICF e os níveis de IL-1 β , TNF- α , interleucina-8 (IL-8) e de MIP-1 α em pacientes sem manifestação de inflamação, e nos estágios iniciais e tardios da mucosite. O grupo de estudo composto por 90 adultos voluntários saudáveis com implantes de titânio. Foram coletadas amostras de sulco peri-implantar utilizando a técnica com um papel de filtro. Tecidos de implantes foram categorizados como clinicamente saudável,

mucosite precoce ou mucosite avançada. Os pacientes do grupo controle (pacientes saudáveis) tem concentrações significativamente mais baixas de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e MIP-1 α em PICF em comparação com ambos os grupos com a mucosite. Correlação positiva foi observada no grupo de 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 prognosticar o insucesso do implante .

Foram examinadas em 2010 as associações *in vivo* entre a composição dos biofilmes subgengivais e os níveis de citocinas liberadas pelos tecidos adjacentes e pelas células, medidas no fluido crevicular gengival (GCF). Os dados gerados também permitiu fazer inferências sobre o potencial envolvimento dos biomarcadores analisados na patogênese das doenças periodontais, ou seja, determinar a relação entre a composição do biofilme subgengival e os níveis de citocinas no GCF, tanto em indivíduos com periodonto saudável, quanto com periodontite agressiva generalizada (GAP). Os parâmetros periodontais foram medidos em 25 indivíduos com saúde periodontal e 31 com GAP.

Amostras de placa subgengival e do GCF foram obtidas a partir de 14 locais (máximo 14 dentes por indivíduo), 40 espécies subgengivais foram quantificadas usando hibridização *checkerboard* DNA-DNA e as concentrações de 8 citocinas (fator estimulante de colonização de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-2, IFN- γ , IL-10, interleucina-13 (IL-13), interleucina-6 (IL-6), IL-1 β e TNF- α no GCF foram medidas usando Luminex, para um total de 551 amostras.

TELES *et al.* (R.P. TELES, 2010) afirmam que havia uma tendência para a IL-2 e IL-13 ser mais elevada na periodontite e IL-10 a ser elevado nos indivíduos com saúde periodontal. As associações entre as proporções médias de cada uma das 40 espécies subgengivais e a percentagem de cada citocina no GCF foram examinados em cada grupo separadamente. Os resultados dos sujeitos com GAP tinham níveis estatisticamente mais elevados e significativos de IL-1 β no GCF. Não houve diferenças estatisticamente significativas na média da proporção de citocinas entre os indivíduos periodontalmente saudáveis, enquanto a proporção de IL-1 β /IL-10 diferiu significativamente entre os grupos, no grupo com periodontite. Diferentes perfis de biofilme subgengival estão associados a padrões distintos de expressão das citocinas no GCF. Indivíduos com periodontite agressiva foram caracterizados por uma maior relação IL-1 β /IL-10 do que indivíduos adultos saudáveis, o que

sugere um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias na periodontite agressiva. Os resultados demonstraram que o grupo de indivíduos com periodontite agressiva generalizada apresentou estatisticamente significativo maior desvio padrão para as proporções de IL-13, IL-6 e IL-1 β . Portanto, os autores apontaram como principais conclusões obtidas neste estudo uma relação maior de IL-1 β /IL-10 em indivíduos adultos saudáveis, sugerindo um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias no grupo com GAP. Uma alta relação IL-1 β /IL-10 em GAP foi acompanhada por maiores proporções de complexas espécies vermelho e laranja. Quanto às implicações práticas, um maior esclarecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imunoinflamatória dos biofilmes polimicrobianos poderiam levar ao desenvolvimento de novas terapias para as infecções periodontais.

Em 2010 avaliaram se a diabetes tipo 2 altera a expressão de mediadores inflamatórios em sítios com periodontite crônica (PC) ou PI. A expressão de TNF- α , a IL-6 e IL-8, e MCP-1 mais chave de receptores de quimiocinas CC (CCR1 a 5) e os receptores de quimiocinas CXC (CXCR1 a 3) foram quantificadas em tempo real pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) em biópsias gengivais ou peri-implante de 135 pacientes com diabetes bem controlada ou mal controlada e doença periodontal; 65 pacientes com doença periodontal, mas de outra maneira saudável, e 90 sistematicamente e periodontalmente indivíduos saudáveis.

Comparando com os controles, em doentes sem diabetes e pacientes com a diabetes bem controlada, a expressão do TNF- α , CCR5 e CXCR3 foi exclusivamente maior em sítios com PI, ao passo que a IL-6 e IL-8 foram super-expressos em locais com PC e, mais ainda, em locais com PI. Em pacientes com controle glicêmico inadequado, TNF- α , CCR5 e CXCR3 mRNAs foram aumentados em locais com PC. A expressão estatisticamente significativa maior de IL-6 e IL-8 de pacientes sem diabetes e pacientes com diabetes bem controlada foi observada em comparação com pacientes com a diabetes mal controlada. Independentemente do estado metabólico / glicêmico, MCP-1 e CCR2 e 4 eram marcadas mais elevados em ambas as patologias bucais examinadas.

VENZA *et al.* (VENZA *et al.*, 2009) com esses resultados mostraram que: 1) em indivíduos sem diabetes e pacientes com diabetes bem controlado, o TNF- α , CCR5 e CXCR3 podem constituir marcadores distintos de PI, 2) falta de controle

glicêmico aboliu as diferenças entre PC e PI em relação à expressão destes mediadores, e 3) diabetes tipo 2 afetou a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-8 , CCR5 e CXCR3.

CANDEL-MARTÍ *et al.* (CANDEL-MARTÍ *et al.*, 2011) realizaram uma revisão de literatura em 2011 relacionando os níveis de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12, a cirurgia de implante dentário e peri-implantite, a fim de esclarecer a utilidade de citocinas, tais como a IL-6 , IL-8, IL-10 e IL-12 na forma de marcadores de doença de peri-implantar (mucosite e peri-implantite). Catorze artigos foram encontrados e classificados em dois grupos relativos níveis de interleucina para: a doença peri-implantar, e a sua influência sobre osseointegração de implantes dentários sem doença peri-implantar. Um aumento dos níveis de IL é observado em pacientes com a doença peri-implantar, embora haja controvérsia sobre o efeito das interleucinas no fluido crevicular e peri-implantite em relação à falha do implante ou o desenvolvimento da doença peri-implantar.

Foram analisados por JAVED *et al.* (2011) (JAVED, F. *et al.*, 2011) o perfil de citocinas pró-inflamatórias no PICF dos pacientes com PI. Quinze estudos (14 caso-controle e um relato de caso) foram incluídos. Quatro estudos mostraram altos níveis de IL-1- β na PICF de implantes afetados pela PI (grupo teste) em comparação com locais (grupo controle) saudáveis. Dois estudos mostraram uma expressão excessiva de IL-6 e IL-8 no PICF de implantes afetados pela PI em comparação com os implantes saudáveis. Um estudo mostrou que um aumento na secreção de IL-6 , IL-8 e matriz de metaloproteinase 1 (MMP-1) por células fibroblásticas cultivadas a partir de sítios de controle em comparação com os de teste. Seis estudos relataram altos níveis de TNF- α , os níveis no PICF de locais teste (PI) em comparação com os locais de controle. Dois estudos mostraram uma associação positiva entre o polimorfismo do gene IL-1 e PI. Um estudo mostrou uma associação negativa entre o polimorfismo do TNF- α e um risco aumentado de PI. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias estão expostos no PICF de pacientes com PI. Os autores concluem que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias estão expostos no PICF de pacientes com PI. Monitorando os níveis de citocinas no PICF, estes devem ajudar na detecção precoce de condições inflamatórias que podem não ser clinicamente aparente.

SEVERINO, NAPIMOGA & PEREIRA *et al.* (2011) (SEVERINO; NAPIMOGA; DE LIMA PEREIRA, 2011) compararam os níveis de citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e interleucina-17 (IL-17) e no PICF entre o grupo de pacientes com PI e pacientes com região peri-implante saudável (HP). O PICF foi coletado a partir de 40 implantes em relação a 25 pacientes, sendo 14 pacientes com PI e 11 HP, totalizando 20 implantes de cada grupo. As amostras coletadas de PCF de cada paciente foram quantificadas para a IL-6, IL-17, IL-8 e IL-10 utilizando o imunoensaio enzimático (ELISA). A expressão de IL-17 foi significativamente maior no grupo PI, quando comparado com HP. Não houve diferença significativa na comparação entre os níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 entre os dois grupos de HP e PI. Além disso, houve uma correlação positiva e significativa entre os níveis de IL-6 e IL-8 no grupo PI. Grupo PI e grupo HP foram observadas mostrando distribuição homogênea entre os dois grupos. O grupo PI apresentou maior média de PD (mm) quando comparada com a HP, respectivamente 4,39 milímetros contra 1,44 milímetros. Supuração estava ausente em todos os casos. No grupo PI encontramos maior expressão de IL-17 quando em comparação com HP, com diferença significativa. No entanto, tanto a IL-6 e a quimiocina IL-8, embora estavam aumentadas no grupo PI, não houve diferença significativa entre os dois grupos. Os pacientes do grupo HP apresentaram maiores níveis de IL-10 em comparação com os pacientes do grupo de PI, mas também não foi observada significativa diferença entre os dois grupos. Houve correlação positiva entre os níveis de IL-6 e IL-8 no grupo PI. Não obstante as demais correlações não apresentaram diferenças significativas. Este estudo demonstra que em pacientes com PI, há um aumento de IL-17, que podem induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e contribuir para a perda óssea em PI.

Em uma revisão sistemática para avaliar a relação entre polimorfismos genéticos e complicações de implantes dentários, DEREKA *et al.* (2012) (DEREKA et al., 2012) encontraram sete artigos que preencheram os critérios de inclusão definidos. Quatro estudos que investigaram a relação potencial entre a perda precoce do implante e polimorfismos genéticos IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- β 1) revelaram nenhuma evidência para apoiar esta associação. Em dois dos três estudos que avaliaram peri-implantite em relação ao genótipo IL-1, os resultados indicam que IL-1, IL-1-a, IL-1b foram

correlacionados para o aumento da infecção dos tecidos peri-implantar e destruição. As questões de projeto e metodologia do estudo restringiram a possibilidade de tirar conclusões robustas. Dentro dos limites dessa análise, pode-se concluir que não existe uma associação óbvia entre polimorfismo genético específico e falha do implante dental em termos de complicações biológicas, apesar que uma tendência deve ser sublinhada, mostrando a relação potencial entre genótipo IL-1 e PI. Estudos prospectivos bem desenhados e devidamente fomentados são necessários para fornecer mais informações.

Em 2013 investigaram os biomarcadores salivares conhecidos e utilizados em estudos epidemiológicos para detecção de periodontite, em uma amostra aleatória de quatrocentos e cinquenta e um indivíduos adultos (20-89 anos) que vivem no sul da Suécia, examinados clinicamente utilizando procedimentos de exame padrão. As amostras de saliva foram recolhidas e analisadas para as concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, lisozima, MMP-8 e metaloproteinase inibidora de tecido (TIMP-1) utilizando ensaios ELISA, ensaio imunofluorométrico ou ensaio Luminex. Os mediadores inflamatórios são liberados pelas células no periodonto inflamado durante a periodontite, e estes incluem a IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . IL-6 atua tanto como uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória, capaz de induzir o crescimento e a diferenciação de células B e T, e indução de proteínas na fase aguda.

Os pacientes com periodontite severa apresentaram elevadas concentrações de IL-1 β e MMP-8 na saliva. Além disso, a relação MMP-8/TIMP-1 foi significativamente maior no grupo com periodontite severa. Os fumantes em comparação com não-fumantes apresentaram níveis significativamente mais baixos de IL-8 e MMP-8 e a proporção MMP-8/TIMP-1 foram encontrados em fumantes. RATHNAYAKE *et al.* (RATHNAYAKE *et al.*, 2012) afirmaram que a variável idade teve apenas uma fraca influência sobre os biomarcadores medidos (dados não apresentados). Este estudo mostra que a IL-1 β , MMP-8 e a razão de MMP-8/TIMP-1 poderiam ser utilizadas como marcadores de doença periodontal em maiores populações.

FONSECA *et al.* (2014) (FONSECA *et al.*, 2014) em um estudo teve como objetivo medir os 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 PICF e saliva de pacientes com doença peri-implantar. Vinte e dois

pacientes desdentados totais foram divididos em dois grupos: MU pacientes com perda óssea ao redor dos implantes até a primeira linha e bolsa com profundidade ≤ 3 mm, e PI em pacientes com pelo menos um implante com perda óssea ao redor duas ou mais linhas e profundidade de bolsa ≥ 4 mm. Pacientes PI teve um percentual maior de placa em comparação com MU. Em PICF, os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores nos sítios de PI em comparação com MU. Na saliva da parótida, IL-8 e IL-12 foram significativamente mais elevados em pacientes com PI.

FONSECA *et al.* concluíram que os níveis elevados de IL-1 β em PICF parecem ser um traço característico de pacientes com periimplantite. O ducto salivar parótida mostrou um aumento significativo da expressão de IL-8, o qual pode estar relacionado com uma resposta sistêmica.

Revisando a literatura observamos a relação entre peri-implantite e o aumento na expressão de diversos mediadores inflamatórios, dentre estes encontramos as citocinas IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α . Também é possível observar que a presença de tais citocinas na saliva é constantemente citada como possível busca pela observação de uma relação entre a presença de mediadores inflamatórios e condições de saúde ou doença tanto na periodontite como, mais recentemente, na peri-implantite.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Previamente, um estudo realizado por Shibi et al. (SHIBLI et al., 2008) teve o objetivo de comparar o biofilme sub e supra gengival em pacientes com periodontite e sem periodontite. Dando continuidade a esse trabalho foram feitas as avaliações da saliva, usando amostras coletadas dos mesmos pacientes do estudo citado, avaliando os níveis de IL-2 , IL-6 , MCP-1 e MIP-1 α em pacientes com periodontite e sem periodontite.

Quarenta e dois indivíduos (idade média de 48,9 anos, 13-51 anos), apresentando implantes em função por pelo menos 2 anos, foram inscritos neste estudo. As amostras foram divididas em 2 grupos: um grupo controle contendo n= 21 amostras com pelo menos um implante dentário saudável e um grupo com periimplantites tendo n=21 indivíduos com pelo menos um implante doente (periimplantite). Um grupo de pacientes desdentado (Des) foi incluído no estudo como forma de controle para a comparação do padrão de expressão das citocinas na saliva dos pacientes com peri-implantite e saudáveis.

Periimplantite caracterizou-se por defeito ósseo maior de 3 mm em forma de taça e uma inflamação na mucosa periimplantar com sangramento à sondagem e/ou supuração. Os parâmetros clínicos avaliados foram índice de placa, sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção (TONETTI; HÄMMERLE; EUROPEAN WORKSHOP ON PERIODONTOLOGY GROUP, 2008).

O protocolo do estudo foi explicado para cada paciente, e o Termo de Consentimento Livre e esclarecido foi assinado e o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Guarulhos aprovou o protocolo do estudo (CEP UnG 113-2008).

4.1-Critérios de exclusão:

Pacientes foram excluídos se tivessem um implante com superfície tratada, patologias locais ou sistêmicas que possam interferir nos resultados, paciente que fizeram uso de antibióticos ou anti-inflamatório em até 6 meses antes do exame clínico, paciente que havia recebido tratamento periodontal ou periimplantar dentro de 6 meses, próteses implanto-suportadas apresentando pilares e/ou parafusos móveis, assim como coroas protéticas fraturadas, paciente que tiveram mobilidade no implante clinicamente detectável (falta de osseointegração) e fumantes.

4.2-Calibração

Foi realizada uma calibração durante um protocolo em um estudo prévio (Shibi *et al.*) (SHIBLI *et al.*, 2008).

4.3-Seleção do Implante

Quarenta e dois implantes dentários foram avaliados (um por paciente). Se o paciente apresentou mais do que um implante funcional saudável, o implante mais recente foi escolhido para o estudo. Todos os pacientes do grupo peri-implantite apresentaram apenas um implante doente. Se o paciente apresentou implantes saudáveis e doentes, ele foi incluído no grupo de periimplantite e o implante doente foi avaliado.

4.4-Exame clínico e radiográfico

Parâmetros clínicos com presença (1) ou ausência (0) de placa, sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração e medidas da PD (mm) e CAL (mm) foram determinados em seis locais por implante (mésio-lingual, lingual, disto-lingual, distovestibular, vestibular e mésio-vestibular). Também foram realizadas radiografia periapicais intra-orais para confirmação do aspecto clínico.

4.5-Coleta de saliva

Foi coletado na clínica amostras de saliva, antes do exame dentário, não houve ingestão de alimentos ou líquidos antes da realização da coleta das amostras.

Foi coletado no mínimo 5 ml de saliva de cada paciente, colocados em um tubo de coleta previamente marcado, os que houveram dificuldade em produzir saliva suficiente mascaram um pedaço de borracha estéril (*parafilm*) para ajudar a estimular a produção de saliva. As amostras foram transferidas para tubos de 50ml, e após a coleta e transferidas para os tubos de análises as amostras foram congeladas a -20 C°.

4.6- Quantificação das citocinas pelo análise Multiplex

Foi utilizada pela análise Multiplex para medir os níveis de IL - 2, IL -6, MCP-1 e MIP-1 α . É um sistema que realiza diversos testes laboratoriais, medindo simultânea e discretamente as múltiplas reações moleculares na superfície de microesferas a partir de uma única alíquota de amostra. Este teste é utilizado para

detectar e quantificar simultaneamente vários analitos alvo em tipos de amostras complexas qualificadas, à base de poliestireno ou esferas magnéticas, com código de cores ou revestidas com anticorpos específicos de analitos, com grânulos que reconhecem diferentes analitos-alvo, os quais são misturados e incubados com a amostra conforme manual do fabricante (Luminex 200 Plataforma Luminex 200 IS Ver 2.3).

4.7-Analise estatística

Em primeiro lugar testamos a normalidade pelo Teste de normalidade – Kolmogorov-Smirnov. Os dados referentes as amostras de saliva, não normais, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Usamos o teste *t-student* para idade e profundidade à sondagem e para parâmetros de Índice de Placa, Índice Gengival, Sangramento a sondagem o teste Mann Whitney. O nível de significância foi fixado em 5%. GraphPad Prism versão 5.0 for Mac Os X (San Diego, CA, USA) foi o programa utilizado neste trabalho.

5. RESULTADOS

O estudo prévio utilizando amostras de placa dos mesmos paciente publicado anteriormente (SHIBLI et al., 2008) mostrou uma diferença entre a microbiota dos implantes dentários saudáveis e doentes, tanto no biofilme supragengival, quanto no biofilme subgengival. As principais diferenças foram os níveis mais elevados de alguns patógenos periodontais conhecidos no grupo com periimplantite.

Com relação a expressão de citocinas presentes na saliva (figura 1), apesar da quantidade de citocinas IL-2 encontrada no grupo nPimp ser maior do que a encontrada no grupo Pimp, ambas eram mais baixas quando comparadas com a do grupo Des. Houve diferença significativa entre os grupos Pimp X Des (Pimp- $0,036 \pm 0,009$, nPimp $0,069 \pm 0,038$).

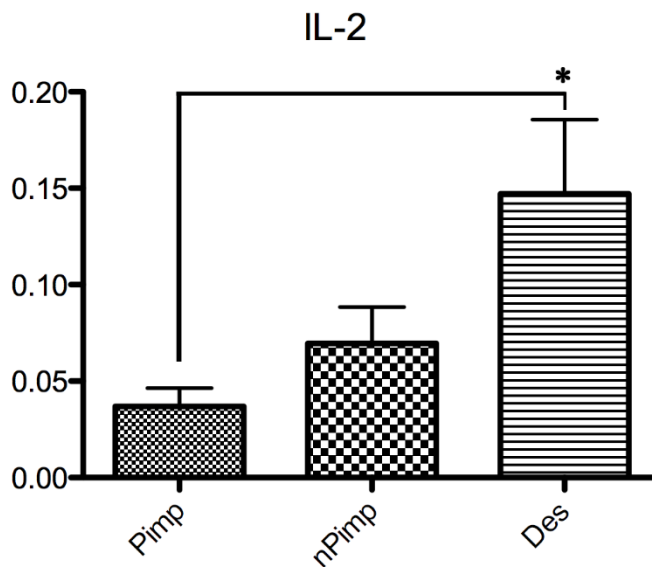


Figura 1. Gráfico apresentando resultados de IL-2 nos grupos.

A quantidade de citocinas IL-6 encontrada no grupo Pimp foi sutilmente maior que a encontrada no grupo nPimp, mas obteve um resultado mais baixo que o encontrado no grupo Des. Não houve diferença significativa entre os resultados (figura 2).

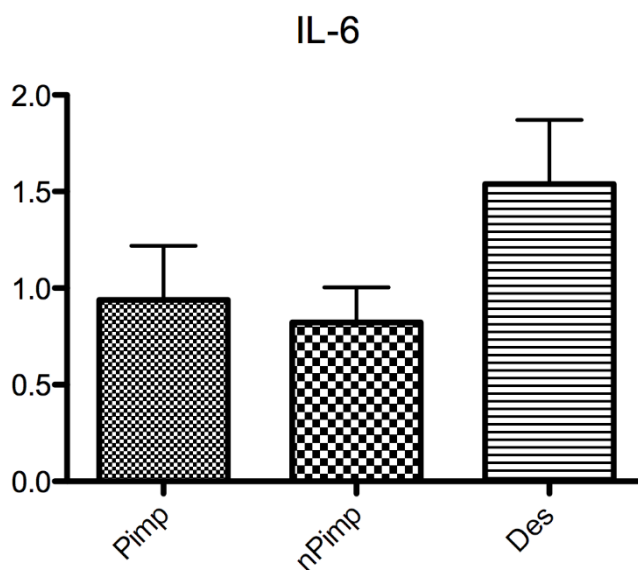


Figura 2. Gráfico apresentando resultados de IL-6 nos grupos.

Mesmo tendo um resultado muito baixo, o nível de MCP-1 encontrado no grupo nPimp é maior do que o encontrado no grupo Pimp (figura 3). E estes são extremamente inferiores quando comparados ao nível encontrado no grupo Des. Existiu diferença significativa entre os grupos Pimp e nPimp X Des (Pimp $22,60 \pm 4,955$, nPimp $65,64 \pm 5,19$).

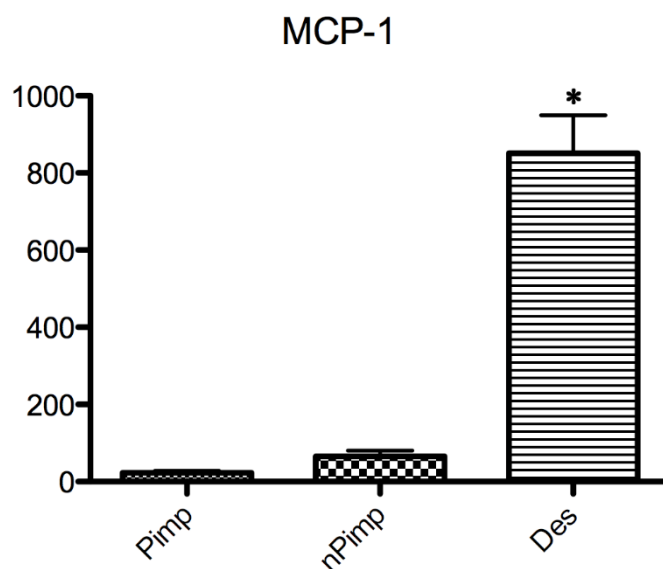


Figura 3. Gráfico apresentando valores de MCP-1 nos grupos.

Além de termos os níveis de MIP-1 a no grupo Pimp muito mais expressivos do que os encontrados no grupo Des, encontramos uma quantidade um pouco mais elevada no grupo nPimp. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos Pimp e nPimp X Des (Pimp $4,040 \pm 0,857$, nPimp $5,000 \pm 1,006$).

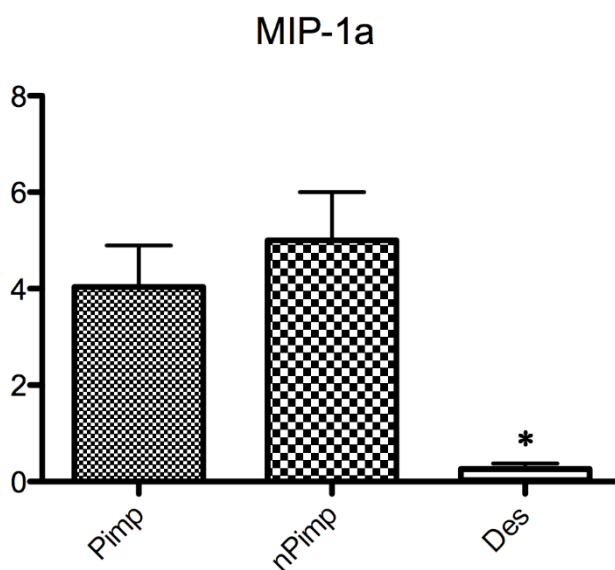


Figura 4. Gráfico apresentando valores de MIP-1a nos grupos.

5. DISCUSSÃO

Devido ao grande uso de implantes de titânio na clínica odontológica, aumentaram também o número de casos em que observamos patologias dos tecidos que os suportam. Temos hoje então uma grande quantidade de casos sujeitos ao fracasso em virtude da PI, e que necessitam de tratamento. Junto com isso, continuamos com a dificuldade de estabelecer o diagnóstico precoce, um correto protocolo de tratamento e determinar-mos um prognóstico fiel para tal patologia.

Avaliando as complexidades da patogênese peri-implantar, procuramos novas estratégias de prevenção e tratamento da PI, portanto, neste trabalho, buscamos quantificar os níveis de IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α através do método *Luminex*, avaliando a influência destes na saliva de pacientes não portadores e portadores de PI, assim buscando um indicador do estado de saúde do implante dentário, podendo evidenciar os riscos de falha do mesmo.

Da mesma forma que não foi encontrado diferença significativa entre os resultados no grupo Pimp e nPimp, quando comparamos o nível de IL-2, CAMPOS *et al.* (MAURER; VON STEBUT, 2004) também afirma que os resultados de seu trabalho indicam que os genes com polimorfismos no IL-2 e IL-6 não estão associados com falha precoce do implante, assim não achando relação direta entre IL-2 e PI.

Já TELES *et al.* (R.P. TELES, 2010) afirmam que havia uma tendência para a IL-2 e IL-13 ser mais elevada na periodontite. Seu trabalho foi realizado utilizando como amostras GCF, portanto, poderíamos talvez ter uma comparação mais clara e encontrar tais resultados se trabalhássemos com a mesma metodologia. Trabalhamos com amostras de saliva, assim não sendo totalmente fiel a comparação entre ambos resultados.

DEREKA *et al.* (DEREKA *et al.*, 2012) encontraram alguns estudos que investigaram a relação potencial entre a perda precoce do implante e polimorfismos

genéticos IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e TGF- β 1. Os próprios autores concluíram que as questões de projeto e metodologia do estudo restringiram a possibilidade de tirar conclusões robustas, porém, dentro dos limites dessa análise, concluíram que não existe uma associação óbvia entre polimorfismo genético específico e falha do implante dental em termos de complicações biológicas quando pesquisado os níveis de IL-2, entre outros. Apesar do estudo presente não ter trabalhado com polimorfismo, entendemos que não temos opiniões divergentes na conclusão de ambos trabalhos.

Devemos levar em consideração que CAMPOS *et al.* (MAURER; VON STEBUT, 2004) utilizou PCR em um estudo de 74 pacientes (média 49,3 anos), TELES *et al.* (R.P. TELES, 2010) utilizou *checkerboard* DNA-DNA e Luminex em GCF em 56 pacientes (18 a 30 anos) e DEREKA *et al.* (DEREKA et al., 2012) realizou uma revisão sistemática, sendo assim, relatamos aqui 3 estudos de formatos diferentes, com número de pacientes diferentes e métodos específicos para cada estudo, e mesmo com tantos vetores, obteve-se a mesma conclusão que este trabalho em 2 casos e divergência em um deles. Isso expressa a dificuldade de conclusões excêntricas e a divergência de resultados nos demonstrando um vasto campo para ser pesquisado afim de alcançar um consenso sobre este tema.

Quando buscamos trabalhos que avaliaram os índices de IL-6 encontramos uma literatura mais vasta, porém, conflitante. SALCETTI *et al.* (SALCETTI J., 1997), SEVERINO *et al.* (SEVERINO et al., 2011), DEREKA *et al.* (DEREKA et al., 2012) e RATHNAYAKE *et al.* (RATHNAYAKE et al., 2012) vão ao encontro dos nossos resultados afirmando que não existe diferença significativa entre o grupo controle e as amostras pesquisadas, cada estudo com as suas peculiaridades, porém com a mesma conclusão quando pensamos em ter algum prognóstico do sucesso ou não do implante.

SALCETTI *et al.* (SALCETTI J., 1997) afirma que os níveis de IL-6 encontrados no GCF foram iguais nos locais de controle do grupo 2, e no grupo 1 nos locais de falência e locais estáveis assim equivalendo aos resultados encontrados em nosso trabalho. CAMPOS *et al.* obteve o mesmo resultado em IL-2 e IL-6, portanto, não associa a falha precoce do implante com índice de IL-6, assim não achando relação direta com a PI.

SEVERINO *et al.* (SEVERINO et al., 2011) afirma que não houve diferença significativa na comparação entre os níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 entre os dois grupos de HP e PI.

DEREKA *et al.* (DEREKA et al., 2012) encontraram alguns estudos que investigaram a relação potencial entre a perda precoce do implante e polimorfismos genéticos IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α e TGF- β 1. Os próprios autores concluíram que as questões de projeto e metodologia do estudo restringiram a possibilidade de tirar conclusões robustas, porém, dentro dos limites dessa análise, concluíram que não existe uma associação óbvia entre polimorfismo genético específico e falha do implante dental em termos de complicações biológicas quando pesquisado os níveis de IL-2, entre outros. Apesar do estudo presente não ter trabalhado com polimorfismo, entendemos que não temos opiniões divergentes na conclusão de ambos trabalhos.

Apesar de RATHNAYAKE *et al.* (RATHNAYAKE et al., 2012) ter trabalhado com saliva e com os níveis de IL-6, ele conclui que outras citocinas como a IL-1 β , MMP-8, entre outras, poderiam ser utilizadas como marcadores de doença periodontal em maiores populações, excluindo assim as citocinas que trabalhamos neste estudo, podendo então elucidar em um outro trabalho tais citocinas para que possa haver uma comparação de resultados e avaliação melhor sobre a hipótese de ser utilizadas como marcadores de doença periodontal.

LINSKMANN *et al.* (LINSKMANN, 2006) , VENZA *et al.* (VENZA et al., 2009) , CANDEL-MARTI *et al.* (CANDEL-MARTI et al., 2011) e JAVED *et al.* (JAVED, F. et al., 2011) já defendem que existe sim possibilidade de trabalhar com um prognóstico do implante instalado, pois encontraram em seus respectivos estudos uma diferença significativa entre o sítio doente e saudável, podendo assim obter uma prévia do risco das patologias peri-implantares.

LINSKMANN *et al.* (LINSKMANN, 2006) avaliaram a relação entre os parâmetros clínicos e as concentrações da citocina pró-inflamatória IL-6. A investigação indicou que os níveis de IL-6 e IL-10 são elevadas na saliva de pacientes com doença periimplantar, em comparação com pacientes saudáveis. Os dados sugerem que a níveis IL-6 > 1,5 pg/mg de proteínas e IL-10 > 1,0 pg/mg de proteína podem ser usado como a base de um teste de diagnóstico para doença periimplantar em pacientes com overdentures implanto-suportada. Estes dados

sugerem que existe uma relação significativa entre a quantidade de uma citocina pró-inflamatória (IL-6) e a resposta inflamatória no tecido peri-implante. Os resultados também sugerem que a IL-6 e IL-10 podiam ser utilizados como marcadores de doença peri-implante em conjunto.

VENZA *et al.* (VENZA *et al.*, 2009) afirma que a expressão estatisticamente significativa maior de IL-6 e IL-8 de pacientes sem diabetes e pacientes com diabetes bem controlada foi observada em comparação com pacientes com a diabetes mal controlada, assim conclui que diabetes tipo 2 afetou a expressão de IL-6 entre outros. Novamente caímos na comparação entre um trabalho com amostra de GFC e outro com amostras de saliva que se divergem nos resultados.

CANDEL-MARTI *et al.* (CANDEL-MARTI *et al.*, 2011) também acharam como resultados um aumento dos níveis de IL é observado em pacientes com a doença peri-implantar.

JAVED *et al.* (JAVED, F. *et al.*, 2011) encontrou alguns estudos que mostraram uma expressão excessiva de IL-6 e IL-8 no PICF de implantes afetados pela PI em comparação com os implantes saudáveis.

Quando mencionamos os níveis de MCP-1 e MIP-1 α , SALCETTI *et al.* (SALCETTI J., 1997) sugerem que estas estavam presentes nos tecidos gengivais comprometidos analisados e que a ausência da sua expressão no tecido gengival periodontal saudável sugere que podem ser responsáveis pela modulação do processo de doença infecciosa, tal como a periodontite.

Independente do que foi achado no mesmo estudo em relação a outras citocinas, VENZA *et al.* (VENZA *et al.*, 2009) afirma que o nível de MCP-1 era marcado com nível mais elevado em ambas as patologias bucais examinadas (PC e PI). E PETROVICK *et al.* (PETKOVIC *et al.*, 2010) vai mais longe ainda ao afirmar que os resultados de seu estudo sugerem que a citocina MIP-1 α pode ser marcador para prognosticar o insucesso do implante.

Levando em consideração as citocinas que outros autores trabalharam, tanto as que RATHNAYAKE *et al.* (RATHNAYAKE *et al.*, 2012) pesquisou (e não estavam em nosso estudo - IL-1 β e MMP-8), quanto as que FONSECA *et al.* (FONSECA *et al.*, 2014) afirmou como indicadores de risco em saliva (IL-8 e IL-12), VENZA *et al.* (VENZA *et al.*, 2009) também avaliando IL-8, entre outros estudos, queríamos avaliar se existiam valores significativamente mais elevados em pacientes com PI

com as citocinas que escolhemos, mas não enxergamos possibilidade de apoiar no resultado obtido neste estudo para afirmar um novo de marcador de risco de PI.

Observando os resultados obtidos não temos como sugerir um protocolo de identificação de risco para o insucesso da instalação de implantes. Podemos sim, afirmar que existe a possibilidade de estudar outras citocinas de outras fontes de amostras em um número de pacientes maior, para quem sabe assim, possamos chegar mais próximo do resultado almejado.

6. CONCLUSÃO

Através do presente estudo podemos concluir que não foram encontradas diferenças significantes na expressão das citocinas IL-2, IL-6, MCP-1 e MIP-1 α na saliva entre os pacientes com implantes saudáveis e com peri-implantite.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T.; JANSSON, T.; LEKHOLM, U. Osseointegrated dental implants. **Dent Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 151-74, Jan 1986.
- ALOUFI, F. et al. Clinical assessment of peri-implant tissues in patients with varying severity of chronic periodontitis. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 11, n. 1, p. 37-40, 2009.
- BECKER, W. et al. Five-year evaluation of implants placed at extraction and with dehiscences and fenestration defects augmented with ePTFE membranes: results from a prospective multicenter study. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 1, n. 1, p. 27-32, 1999.
- 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.
- CANDEL-MARTI, M. E. et al. Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p. e518-e521, 2011.
- CHARALAMPAKIS, G. et al. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. **Clinical oral implants research**, v. 23, n. 9, p. 1045-1054, 2012.
- COX, J.; ZARB, G. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 2, n. 2, p. 91-100, 1987.
- DEREKA, X. et al. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 7, p. 775-88, Jul 2012.
- F., A. T. I. Consensus report of session IV. **Proceedings of the First European Workshop on Periodontology**. London: Quintessence.
, p. 365-369, 1994.
- 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.
- FRANSSON, C. et al. Extent of peri-implantitis-associated bone loss. **Journal of clinical periodontology**, v. 36, n. 4, p. 357-363, 2009.
- GONÇALVES, R. et al. [The role of chemokines in uveitis]. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 70, n. 2, p. 363-370, 2007.

HEITZ-MAYFIELD, L. J. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 292-304, Sep 2008.

IBGE, F. Indicadores sociais: uma análise da década de 1980., 1995.

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.

JAVED, F. et al. Comparison of periodontal and socioeconomic status between subjects with type 2 diabetes mellitus and non-diabetic controls. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 11, p. 2112-2119, 2007.

KARBACH, J. et al. Comparison of five parameters as risk factors for peri-mucositis. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 24, n. 3, p. 491-496, 2009.

KOTSOVILIS, S.; KAROUSSIS, I. K.; FOURMOUSIS, I. A comprehensive and critical review of dental implant placement in diabetic animals and patients. **Clinical oral implants research**, v. 17, n. 5, p. 587-599, 2006.

KREUTZ, M. et al. Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. **Research in immunology**, v. 143, n. 1, p. 107-115, 1992.

LAINE, M. et al. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 4, p. 380-385, 2006.

LISKMANN, S., VIHALEMM, T., SALUM, O., ZILMER, K., FISCHER K. & ZILMER, M. Correlations between clinical parameters and interleukin- 6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with periimplant disease. **Int J Oral Implants Maxillofac** v. 4, p. 543-50, 2006.

MARRONE, A. et al. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 8, p. 934-40, Aug 2013.

MASASHI, M. et al. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Clinical oral implants research**, v. 13, 2002.

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 10, p. 1882-6, Oct 2004.

MOMBELLI, A.; CIONCA, N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. **Clinical oral implants research**, v. 17 Suppl 2, p. 97-103, 2006.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 9, n. 3, p. 248-266, 1998.

PANAGAKOS, F. et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 11, n. 6, p. 794-799, 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.

R.P. TELES, L. C. G., M. FAVERI, E.A. ROSA, F. R. F. TELES, M. FERES, S.S. SOCRANSKY, AND A.D. HAFFAJEE. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 4, p. 313–323, 2010.

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. **PloS one**, v. 8, n. 4, 2012.

RATHNAYAKE, N. et al. Salivary biomarkers of oral health: a cross-sectional study. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. 2, p. 140-147, 2013.

SALCETTI J., M. J., COOPER L., SMITH F., COLLINS J., SOCRANSKY S., OFFENBACHER S. . The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. **INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS**, v. 12, p. 32–42, 1997.

SEVERINO, V. O.; NAPIMOGA, M. H.; DE LIMA PEREIRA, S. A. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 8, p. 823-8, Aug 2011.

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.

TOGASHI, A. Y. et al. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 15, n. 5, p. 442-447, 2007.

TONETTI, M.; HÄMMERLE, C.; EUROPEAN WORKSHOP ON PERIODONTOLOGY GROUP, C. Advances in bone augmentation to enable dental implant placement: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **Journal of clinical periodontology**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 168-172, 2008.

VARELLA, P. P. et al. Relationship between fluid-attenuated inversion-recovery (FLAIR) signal intensity and inflammatory mediator's levels in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and mesial temporal sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 1, p. 91-9, Feb 2011.

VENZA, I. et al. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 1, p. 99-108, 2009.

ZANATTA FB, A. R., ROSING CR, MIRANDA LA. . A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T HELPER NA PERIODONTITE CRÔNICA T helper cells participation on chronic periodontitis **R. Periodontia.**, v. 2, p. 7-13, 2009.