



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**



**RAFAELA FERNANDA MELO**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA,  
IMUNOLÓGICA E GENÉTICA EM PACIENTES  
COM IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS**

**ARARAQUARA**

**2009**

Melo, Rafaela Fernanda

Avaliação clínica, microbiológica, imunológica e genética em pacientes com implantes osseointegrados / Rafaela Fernanda Melo . – Araraquara: [s.n.], 2009.

116 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Profa. Dra. Glória Maria de Azevedo Thompson

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> R. Adriana C. Marcantonio

Prof. Dr. Elcio Marcantonio Jr

1. Interleucina-1 2. Interleucina-6 3. Fluido do sulco gengival 4.

Polimorfismo genético I. Título

**Rafaela Fernanda Melo**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, MICROBIOLÓGICA, MICROBIOLÓGICA,  
IMUNOLÓGICA E GENÉTICA EM PACIENTES COM IMPLANTES  
OSSEOINTEGRADOS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Glória Maria de A. Thompson Galli

2º Examinador: Profa. Dra. Débora Pallos

3º Examinador: Prof. Dr. Eduardo Saba-Chujfi

4º Examinador: Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio

5º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 16 de setembro de 2009.

## Dados Curriculares

### **Rafaela Fernanda Melo**

- Nascimento:** 23/03/1979 – Sorocaba – S.P.
- Filiação:** José Benedito Melo  
Eda Aparecida Benette Melo
- 1999 – 2002:** Curso de Graduação  
Faculdade de Odontologia de Araraquara –  
UNESP – Foar
- 2004 – 2006:** Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível  
Mestrado pela Faculdade de Odontologia de  
Araraquara – UNESP – Foar
- 2006 – 2009:** Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível  
Doutorado pela Faculdade de Odontologia de  
Araraquara – UNESP – Foar

*Dedico este trabalho...*

*... aos meus pais*

por todo apoio concedido durante todos estes anos. A compreensão e amor e paciência e incentivo que me deram para que pudesse chegar até aqui. Sem o esforço de vocês as coisas teriam seguido um outro caminho e esta etapa não teria chegado ao fim.

*... ao meu irmão*

mesmo estando longe sempre esteve presente em todos os momentos com seus questionamentos e opiniões para que tudo acontecesse da melhor maneira possível.

*Dedicatória especial...*

*...a Deus*

agradeço por estar presente em todos os momentos da minha vida. Por me guiar, me iluminar e me amparar nos instantes de maior aflição e angústia. Porém, sobretudo, devo agradecer por me oferecer momentos de eternas alegrias e satisfação. A vida torna-se muito mais bela nas coisas mais simples e puras que nos oferece.

## *Agradecimentos especiais...*

### *...à minha orientadora Glória*

por toda dedicação, orientação e paciência em me passar um pouco do conhecimento que tens. Esses cinco anos de convívio foram de muito aprendizado e acredito também ter estabelecido um vínculo de amizade e não apenas orientador/orientado. Muito obrigada!

### *...à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> R. Adriana C. Marcantonio*

por toda confiança em mim depositada durante esses 8 anos, afinal tudo começou durante meu curso de graduação. Deixo aqui as minhas palavras de minha mais sincera admiração, por sua vontade em fazer com que as coisas aconteçam e a maneira como se empenha em seus projetos. Uma pessoa humilde e que está sempre aberta em ajudar a todos, sem distinção.

*...ao Profº Dr. Elcio Marcantonio Junior*

gostaria de agradecer o apoio durante o curso. Admiro sua competência e dedicação.

*...ao Profº Dr. Jamil Awad Shibli*

pela ajuda concedida para que este trabalho pudesse ser realizado.



## *Agradecimentos*

Meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, em particular:

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e Vice-Diretora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Afonso Barreto Montandon.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação – Periodontia, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, pela dedicação e esforço empreendidos na administração deste curso.

Aos docentes da Disciplina de Periodontia, Prof. Dr. Benedicto Egbert Côrrea de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Profa. Dra. R. Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior e Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico, que colaboraram com a minha formação de tão variadas formas.

Aos Prof. Joni, Zé Eduardo, Débora e Eduardo Saba pelo comparecimento e colaboração à tese apresentada.

Ao Prof. Sandro Valentim por disponibilizar o uso do seu laboratório no início deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, que concedeu bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da disciplina de Periodontia, Cláudia, Regina Lucia, Maria do Rosário, Zezé, Sueli, Toninho e Telma, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitaram a realização deste trabalho.

A Regina Lúcia pela paciência, cooperação e empenho para que tudo seja da forma mais organizada possível.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Mara, Rosangela, Vera e Alexandre pela paciência e competência.

A todos os funcionários desta faculdade, em especial aos funcionários da Biblioteca, Ceres, Marley, Eliane, Maria Aparecida, Odete, Adriano , Eliane, Maria Inês e Silvia pela colaboração e paciência.

A todos os meus colegas de curso, Dani, Rafa Faeda, Rafa Sartori, Fabio, Roberto e Gabriela pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas companheiros de laboratório, Morgana, Sabrina, Rafa Sartori e Fabio pelo companheirismo e ajuda durante os experimentos.

Aos Profs. e colegas da São Leopoldo Mandic, Prof. Dr. Eduardo Saba-Chujf, Silvio, Fabio e Alvaro pela paciência e confiança.

A amiga Dani Zandim que sempre foi muito presente em todos os momentos, desde o início do mestrado, me dando apoio, amizade e compreensão sempre que precisei. Só tenho a agradecer por todos estes anos de convívio em que nossa amizade se tornou verdadeira.

A amiga Claudinha que inúmeras vezes ouviu as angustias, mas também dividiu muitas das alegrias vividas, afinal ela estava ali, no laboratório da frente, sempre pronta para ouvir e dar seus conselhos. Uma pessoa muito dedicada e pronta para ajudar em tudo que ela puder. Muito obrigada pela amizade, paciência e por todo o carinho.

A amiga Bia não apenas pela parte estatística deste trabalho, mas, sobretudo pelos anos de convivência. Uma pessoa extremamente preocupada e pronta para qualquer coisa e em qualquer momento. Muito obrigada por sua amizade durante todos estes anos.

As mais do que amigas, Morgana e Sabrina, vocês estiveram presentes em todos os momentos destes últimos anos. Vocês foram as mais sinceras companheiras, estiveram ao meu lado nos momentos em que mais precisei me amparando e fazendo de tudo e mais um pouco para que as coisas seguissem da melhor forma possível. Impossível descrever os bons momentos... foram tantos... As mais verdadeiras

amizades que poderiam ter acontecido em Araraquara. Vocês foram minhas verdadeiras companheiras e cúmplices por estes anos. Vou sentir muitas saudades!

*Muito obrigada!!!*

## SUMÁRIO

Resumo	15
Abstract	18
INTRODUÇÃO REVISADA	21
PROPOSIÇÃO	33
MATERIAL e MÉTODO	35
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91
ANEXOS	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Aa** - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

**Bi** - *Bacteroides intermedia*

**Bg** - *Bacteroides gingivalis*

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**GCF** - Fluido crevicular gengival

**IL** – Interleucina

**IL-RN** – interleucina do receptor antagonista

**min.** - Minuto

**RFLP** - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

**SNP** - Polimorfismo de nucleotídeo único

**Pg** - *Porphyromonas gingivalis*

**PCR** - Reação de polymerase em cadeia

**RPM** - Rotação por minuto

**seg.** - Segundo

**Tf** - *Tannerella forsythia*

**U** - unidades

*Resumo*



Melo RF. Avaliação clínica, microbiológica, imunológica e genética em pacientes com implantes osseointegrados. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi o de avaliar possíveis interações clínicas, microbiológicas, imunológicas e genéticas que possam influenciar o sucesso de implantes osseointegrados. Foram avaliados 47 implantes, em 47 pacientes, sendo 31 em condições de saúde (G I) e 16 com perimplantite (G II) e 47 dentes, dos quais 31 estavam sadios e eram dos pacientes com implantes sadios (G III) e 16 dentes sadios dos pacientes com perimplantite (G IV). Foi realizado exame clínico completo em todos os implantes e dentes selecionados. Amostras de fluido crevicular perimplantar/gengival do sítio com maior profundidade de sondagem foram coletadas. A avaliação das bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* foi realizada pela técnica de PCR e, a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 foi realizada pelo teste ELISA. Células da mucosa bucal foram coletadas para avaliação dos polimorfismos *IL1B*+3954, *IL1B*-511 e *IL6*-174. A avaliação estatística dos parâmetros clínicos SS, SUP, PS e NI revelaram que os implantes do grupo G II apresentaram piores condições clínicas em comparação ao grupo G I. O grupo G II também apresentou piores condições clínicas que o grupo G IV para PS e NI. A análise

microbiológica revelou que a bactéria *A. actinomcetemycomitans* não estava presente em nenhum sítio avaliado. *P. intermedia* também não foi encontrada no grupo G II. As bactérias estudadas apresentaram proporções semelhantes em todos os grupos avaliados, não havendo diferença entre os grupos. Na análise da concentração de IL-1 $\beta$  e IL-6, não houve diferenças significativas entre os grupos. A população estudada está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os polimorfismos estudados não demonstraram predominância dos alelos e dos genótipos. Nenhum polimorfismo foi associado à condição de doença.

Palavras-chave: interleucina-1; interleucina-6; fluido do sulco gengival; polimorfismo genético

*Abstract*

Melo RF. Clinical, microbiological, immunological and genetics assessments in patients with osseointegrated oral implants. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

## **Abstract**

The aim of the present study was to evaluate clinical, microbiological, immunological and genetics parameters in patients with implant loaded at least for one year. It was examined 47 implants and teeth in 47 patients. Thirty one of those implants were healthy implants (G I), sixteen had peri-implantitis (G II) and, 31 healthy teeth was from patients with healthy implants (G III) and 16 healthy teeth from patients with peri-implantitis (G IV). Clinical parameters were recorded from all implants and teeth. Gingival crevicular fluid from the highest pocket depth was collected to evaluate the presence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. Forsythial* and to evaluate the concentration of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6. Cells from buccal mucosa were collected for genomic DNA extraction and analyze the polymorphism IL-1B +3954, IL-1B -511 e IL-6 -174. G II demonstrated worst results for PD, BPD, Sup and NI when compared to G I and, when compared with G IV it was worst for PD and NI. Microbiological did not detect *A. actinomycetemcomitans* in any of the sites analysed and, *P. intermedia* was not detected in G II. Bacteria analyzed was present in same proportion in all analyzed sites showing, no differences between groups. There was no difference in the concentration of IL-1 $\beta$  an IL-6

detected between groups. The population studied was in Hardy-Weinberg Equilibrium. There was no differences in the alleles and polymorphism distribution on the studied population.

Key words: interleukin-1; interleukin-6; gingival crevicular fluid; polymorphism, genetic

*Introdução*  
*Revisada*

# 1 Introdução Revisada

A utilização de implantes osseointegrados tem sido empregada para a reabilitação de arcos parcial ou totalmente desdentados com altos índices de sucesso<sup>1,50,66</sup>. No entanto, o sucesso dos implantes está diretamente relacionado ao princípio da osseointegração. Inicialmente, a osseointegração foi definida como a conexão direta, estrutural e funcional entre osso vital organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional. Na realidade, biologicamente não existe evidência de contato total entre osso e implante, mas sim de maior ou menor quantidade de tecido fibroso<sup>16</sup>.

Albrektsson et al.<sup>5</sup> (1986) propuseram alguns critérios clínicos para o sucesso dos implantes osseointegrados que foram mais tarde modificados por Smith, Zarb<sup>98</sup> (1989). Os critérios incluem ausência de mobilidade do implante quando não conectado à prótese; ausência de radiolucidez perimplantar; perda óssea vertical anual menor que 0,2mm, após o primeiro ano em função; ausência de sinais e sintomas persistentes e/ou dor, infecção, parestesia ou violação do canal mandibular; o implante deve estar conectado à prótese e em função. O não cumprimento a algum destes critérios leva o implante a uma condição de “sobrevivente”, ou seja, apesar de ainda estar em função apresenta algum tipo de problema<sup>14</sup>.

Apesar dos altos índices de sucesso os implantes osseointegrados podem apresentar falhas. As falhas biológicas podem estar relacionadas ao não estabelecimento ou na dificuldade de manutenção da osseointegração e podem ser classificadas em dois tipos: precoce, quando não há o estabelecimento de uma osseointegração, ou tardia, quando não há manutenção de uma osseointegração estabelecida <sup>22</sup>. Independentemente da classificação, a falha biológica está diretamente relacionada à presença de uma cápsula fibrosa ao redor do implante, podendo levar à mobilidade deste implante <sup>14,77</sup>. As falhas tardias dos implantes podem ser intimamente relacionadas à presença de uma infecção bacteriana, sendo que diversos estudos relatam a falência de implantes decorrentes de infecção bacteriana perimplantar <sup>22,48-49,52,94</sup>. No entanto, deve estar claro que o termo “perimplantite”, definido no 1º Workshop Europeu de Periodontia em 1993 como um processo inflamatório envolvendo os tecidos ao redor dos implantes osseointegrados em função que resulta em perda de tecido ósseo de suporte<sup>5</sup>, não implica em falha ou perda do implante. Um processo infeccioso nos tecidos perimplantares não significa que o implante está ou será perdido<sup>90</sup>.

A doença perimplantar assim como a doença periodontal tem como fator etiológico primário bactérias específicas relacionadas à placa bacteriana <sup>12,51,53,61,93,90</sup>. Estudos microbiológicos demonstram que tecidos em condições de saúde perimplantar apresentam uma população microbiana predominantemente composta de cocos facultativos Gram-



positivos<sup>62,93</sup>, enquanto que em condições de doença ocorre uma alteração na composição microbiana predominando bastonetes anaeróbios Gram-negativos<sup>93-94</sup>. Periodontopatógenos específicos como *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Tannerella forsythia* (Tf) tem sido correlacionados com a progressão da doença<sup>71</sup>. Ainda, a falência de implantes tem sido associada à periodontopatógenos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Bacteroides intermedius* (Bi) e *Bacteroides gingivalis* (Bg)<sup>10</sup>.

A colonização dos implantes por microrganismos ocorre logo após sua instalação<sup>82</sup>. Uma semana após a instalação dos implantes os periodontopatógenos encontrados nos implantes são os mesmos presentes nos dentes remanescentes<sup>20</sup>. Da mesma maneira, Gerber et al.<sup>30</sup> (2006) avaliaram a microbiota de dentes e implantes e não encontraram diferenças. A presença de bactérias no fluido crevicular, aproximadamente 30 minutos após a instalação do implante, foi confirmada por Fürst et al.<sup>27</sup> (2007). Os autores concluíram que a complexa microbiota estabelecida logo após a instalação dos implantes não diferem daquela encontrada nos dentes adjacentes. Recentemente, Salvi et al.<sup>91</sup> (2008) investigaram a presença de bactérias no fluido crevicular de implantes osseointegrados e dentes adjacentes. Neste estudo, os autores relataram uma maior prevalência de *Fusobacterium* e espécies de *Streptococcus*, *P. micros* e *S. aureus* do que de bactérias normalmente associadas à periodontite. Bactérias associadas à doença periodontal, como *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram

detectadas com a mesma prevalência 30 minutos e 12 meses após a instalação dos implantes, tanto nos implantes quanto nos dentes adjacentes avaliados. Para estes autores, existem espécies bacterianas mais importantes do que as relacionadas à doença periodontal envolvidas na perimplantite e, estas devem ser investigadas para uma melhor elucidação de sua patogênica frente à doença perimplantar.

Embora exista semelhança nas espécies bacterianas encontradas nos sítios perimplantares e periodontais, o tecido mucoso nestas duas condições apresenta diferenças importantes em relação ao processo inflamatório. Nos implantes osseointegrados as fibras colágenas supra-ósseas estão orientadas paralelas à superfície do implante, sem inserção nesta superfície, enquanto que nos dentes as fibras colágenas são perpendiculares e estão inseridas no cimento <sup>37</sup>. Histologicamente, a organização do tecido perimplantar é diferente ao periodontal de forma que o combate à progressão de lesões associadas à placa bacteriana resulta em um infiltrado inflamatório mais amplo e com uma lesão de maior extensão apical, quando comparado ao tecido gengival <sup>48</sup>. Estas diferenças, na inserção dos dentes e implantes, podem caracterizar uma importante diferença no processo inflamatório frente à doença, a qual pode apresentar uma progressão mais rápida e severa da doença nos tecidos perimplantares.

A infecção bacteriana estimula a produção de mediadores inflamatórios que irão provocar a destruição do tecido conjuntivo e osso

alveolar. Esses mediadores são secretados no fluido crevicular gengival (GCF) por leucócitos e células do epitélio juncional ativadas, contribuindo para a destruição do tecido periodontal e estimulando a reabsorção óssea<sup>28,73</sup>. Assim, as bactérias presentes na placa bacteriana podem causar injúria diretamente pela produção e liberação de enzimas, toxinas e metabólitos<sup>51,73</sup> ou indiretamente por estimular a resposta imune-inflamatória do hospedeiro<sup>51,73,80</sup>. A intensidade com que o sistema imune do hospedeiro responde à infecção bacteriana é um fator determinante para o início e progressão da doença. Estudos realizados com gêmeos indicam que 50% das variações na doença periodontal são atribuídas à diversidade genética<sup>58</sup>. Alguns polimorfismos encontrados nos genes da família da interleucina-1, *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, podem influenciar na suscetibilidade e expressão da doença<sup>67</sup>.

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as Interleucinas -1, e -6 e a prostaglandina E<sub>2</sub> são algumas das citocinas inflamatórias associadas à doença periodontal<sup>28-29,59,79</sup>. Estas citocinas podem ser consideradas como marcadores da doença periodontal ativa e apresentam capacidade de induzir a reabsorção óssea<sup>65</sup>.

A IL-1 foi uma das primeiras citocinas descritas e amplamente estudada. Possui capacidade de causar febre, estimular proteínas hepáticas de fase aguda, aumentar a resposta linfocitária, induzir alterações degenerativas nas articulações e aumentar a quantidade de células da medula óssea<sup>21</sup>. A família da IL-1 é composta por três polipeptídios, interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e antagonista

do receptor da interleucina-1 (IL-1Ra). As interleucinas são primeiramente produzidas na forma precursora inativa ou parcialmente ativa. A pró-IL-1 $\beta$  não apresenta atividade biológica, necessitando ser clivada em um peptídeo de 17KDa que apresenta atividade biológica<sup>21,69</sup>.

A IL-1 $\beta$ , um importante mediador do processo inflamatório, é secretada no fluido crevicular gengival primeiramente por macrófagos e monócitos, e pode também ser secretada posteriormente por leucócitos e células do epitélio juncional<sup>29,73</sup>. Esta citocina está relacionada às fases aguda e crônica da doença<sup>69</sup>, e tem especial importância nas infecções bacterianas Gran-negativas, como a periodontite. A IL-1 $\beta$  é um mediador químico ativado por lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular e metabólitos bacterianos<sup>24,32,40,73</sup>. Apresenta atividade catabólica de destruição óssea, contribuindo para a ativação de osteoclastos<sup>68</sup>, assim como atividades biológicas relacionadas ao seu papel de destruição tecidual na doença periodontal. Estas atividades incluem inibição de formação óssea, estimulação da síntese de prostaglandinas, tromboxanos, colagenases e proteases, potencialização da degranulação de neutrófilos, produção de superóxido, aumento da adesão leucocitária de células endoteliais e estímulo da proliferação de fibroblastos e queratinócitos<sup>99</sup>.

Na última década estudos buscaram elucidar a correlação entre as condições clínicas dos implantes osseointegrados, com a concentração da IL-1 $\beta$  no fluido crevicular gengival.

Kao et al.<sup>41</sup> (1995), Panagakos et al.<sup>75</sup> (1996) e Murata et al.<sup>66</sup> (2002), demonstraram que a concentração de IL-1 $\beta$  no fluido crevicular perimplantar, está aumentada na condição de doença, quando comparada à saúde perimplantar. A observação de que a concentração da IL-1 $\beta$  no fluido crevicular gengival aumenta de acordo com o grau de severidade da doença (saúde, mucosite e perimplantite), sugere que esta citocina está relacionada à rápida e ampla destruição do tecido de suporte observado durante o processo de doença<sup>75</sup>. O monitoramento da concentração de IL-1 $\beta$  pode também proporcionar um indicador para a condição de saúde/doença dos implantes osseointegrados<sup>41</sup>. Ataoglu et al.<sup>9</sup> (2002) avaliaram a concentração de IL-1 $\beta$  no fluido crevicular perimplantar de pacientes fumantes e não fumantes que apresentavam implantes em condições satisfatórias. Os autores demonstraram que a concentração de IL-1 $\beta$  detectada em pacientes fumantes, é inferior a de pacientes não fumantes e também sugerem que o monitoramento da concentração de IL-1 $\beta$  presente no fluido crevicular perimplantar pode auxiliar no diagnóstico de saúde perimplantar em pacientes não fumantes.

A produção dos mediadores inflamatórios, como a IL-1, em resposta à infecção bacteriana, pode também estar sob influência de fatores genéticos<sup>67</sup>. Variações no genoma podem ocorrer como polimorfismos. Os polimorfismos genéticos são caracterizados por variações na sequência de nucleotídeos em uma região específica do DNA e estão presentes em pelo menos 1% da população. Algumas variações do genoma ocorrem como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP – single

nucleotide polymorfism). SNP é considerado a marca genética mais comum no genoma humano e é caracterizado pela alteração de uma única base na seqüência do gene. Desta forma, um SNP define dois alelos, e conseqüentemente três possíveis genótipos em uma população<sup>101</sup>. No genoma o SNP pode aparecer a cada 100 – 1000pb, como resultado de uma mutação por deleção, inserção ou substituição<sup>18,92,67</sup>. Os SNPs podem ser encontrados em exons, introns, regiões intergênicas, promotores e enhacer<sup>95</sup>. Quando ocorrem na região promotora ou no enhancer podem modificar a expressão do gene, e quando ocorrem no exon podem alterar a seqüência de aminoácidos da proteína e influenciar sua atividade biológica. Os genes das citocinas têm significativo papel na expressão dos mecanismos da resposta imune, por isso os SNPs destes genes vêm sendo amplamente estudados<sup>101</sup>.

A citocina IL-1 $\beta$  é codificada pelo gene *IL1B* que está localizado no braço longo do cromossomo 2<sup>96</sup>. Polimorfismos presentes neste gene podem influenciar a produção da IL-1 $\beta$  in vivo<sup>108</sup> e in vitro<sup>42</sup>. O gene *IL1B* possui dois SNP em sua região promotora, *IL1B* -31<sup>101</sup> e *IL1B* -511<sup>31</sup> e um SNP no exon 5, *IL1B* +3954<sup>35</sup>. O polimorfismo *IL1B* +3954 parece ter maior influência na expressão do gene, levando a níveis aumentados de IL-1 $\beta$  no fluido crevicular. A presença do alelo T no lócus +3954 do gene *IL1B* é mais freqüente em pacientes periodontalmente comprometidos, quando comparada aos controles saudáveis<sup>87</sup>.

Kornman et al. <sup>43</sup>(1997) demonstraram que os maiores níveis de IL-1 $\beta$  estão relacionados ao alelo T (genótipo positivo: T/T e T/C) em pacientes não fumantes com doença periodontal, e que em pacientes fumantes a severidade da doença não pode ser correlacionada ao genótipo. Por outro lado, Feloutzis et al. <sup>23</sup>(2003) encontraram maiores perdas ósseas em pacientes fumantes pesados, com genótipo positivo, o que pode ser um indicativo de maior risco à perda óssea perimplantar. Da mesma maneira, Gruica et al. <sup>34</sup>(2004) encontraram uma clara correlação entre o genótipo positivo e paciente fumante pesado, dos quais 50% apresentaram falência de implante ou complicações biológicas, podendo haver um efeito somatório entre o genótipo IL-1B positivo e o hábito de fumar.

A citocina pró-inflamatória multifuncional IL-6 é semelhante à IL-1 $\beta$ . A produção de IL-6 realizada por macrófagos normalmente é estimulada pelo LPS bacteriano, enquanto que a produção por fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e osteoblastos é estimulada principalmente em resposta a outras citocinas, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ <sup>4,97</sup>.

A IL-6 desempenha importante papel na resposta imune, inflamatória e de fase aguda, atuando principalmente na proliferação e diferenciação celular. Estimula a diferenciação de linfócitos B, proliferação de linfócitos T, regula a hemocitopoese na medula óssea e, assim como a IL-1, induz a secreção celular de outras citocinas <sup>97</sup>. No metabolismo ósseo, age sozinha ou sinergicamente com outras citocinas, estimulando diferenciação e ativação osteoclástica <sup>57,88</sup>. Níveis aumentados de IL-6

foram relacionados a diversas doenças, como artrite reumatóide, artrite juvenil sistêmica, osteoporose e psoríase<sup>39</sup> e foi considerada como um possível marcador diagnóstico para doença periodontal<sup>28,84</sup>.

A produção IL-6 é regulada pelo gene *IL6* que está localizado no braço curto do cromossomo 7. Um dos polimorfismos de nucleotídeo único descritos para o gene *IL6* ocorre na região promotora -174, onde ocorre a troca de um nucleotídeo G (guanina) por um nucleotídeo C (citosina). Essa alteração afeta a expressão do gene *IL6*, de forma que indivíduos homocigotos para o alelo G apresentam maiores concentrações de IL-6 no plasma<sup>25,72,81</sup>. A presença do alelo G foi relacionada à maior transcrição gênica e concentrações plasmáticas mais altas desta citocina.

Fishman et al.<sup>25</sup>(1998) encontraram uma maior frequência do genótipo G/G em pacientes com artrite crônica juvenil além de observar uma concentração plasmática, de IL-6, cerca de duas vezes maior nestes pacientes. Estudos buscam avaliar uma correlação entre o polimorfismo para o gene *IL6* com as doenças sistêmicas e, os resultados apresentados têm sido bastante controversos<sup>78,86,107</sup>. Trevillato et al.<sup>104</sup>(2003) investigaram a influência do polimorfismo *IL6* -174 em pacientes com e sem doença periodontal e observaram a existência de uma relação positiva para o alelo G e o desenvolvimento de doença periodontal. Em concordância com esses achados, Tervonen et al.<sup>102</sup>(2007) também encontraram uma relação entre o genótipo positivo (alelo G) e o acometimento pela doença periodontal. A relação positiva



entre o polimorfismo *IL6* -174 e a doença periodontal também foi investigada por de Moreira et al.<sup>64</sup>(2007). Em uma busca de uma relação entre o genótipo positivo para este polimorfismo e a doença periodontal, estes autores observaram que todos os pacientes, não fumantes, com doença periodontal severa apresentavam genótipo positivo. Sugerindo assim, uma associação entre o alelo G e a severidade da doença periodontal.

A literatura tem poucos estudos sobre a relação deste polimorfismo com implantes osseointegrados e nenhum que o relacione com a doença perimplantar. Um único trabalho foi encontrado que investigou a relação entre a perda precoce de implantes e o polimorfismo *IL6* -174. Campos et al.<sup>15</sup> (2005) avaliaram 40 pacientes com implantes sadios e 34 com perda precoce. As distribuições genotípicas para os grupos estudados não apresentaram diferença e os autores sugerem que a falta de associação entre o polimorfismo e a condição do implante pode ser em decorrência do reduzido tamanho da amostra estudada.

*Proposição*

## 2 Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar possíveis interações clínicas, microbiológicas, imunológicas e genéticas que possam influenciar o sucesso de implantes osseointegrados. Para tanto, foram estabelecidos 4 objetivos específicos:

Objetivo 1: Avaliação clínica dos implantes com pelo menos um ano sob função.

Objetivo 2: Identificação das bactérias nos sítios perimplantares.

Objetivo 3: Avaliação das IL-1 $\beta$  e IL-6 presentes no fluido crevicular.

Objetivo 4: Identificação dos polimorfismos dos genes *IL1B* e *IL6*.

*Material e  
Método*

## **3 Material e Método**

### **3.1 Casuística**

A população avaliada neste estudo foi composta por 47 pacientes desdentados parciais, com idade média de 45,98 anos, de ambos os gêneros, selecionados na Clínica de Especialização em Implantodontia - FOAr. Os pacientes deveriam apresentar implantes com a prótese definitiva, implanto-suportada, por no mínimo um ano.

Os indivíduos deveriam apresentar boas condições de saúde, com história médica negativa para doenças crônicas como as cardiovasculares, hepatite, febre reumática, asma, diabetes, desordens imunes e sanguíneas, história negativa de antibioticoterapia ou uso de anti-inflamatórios esteróides ou não-esteróides nos 6 meses antecedentes ao estudo. As próteses sobre implantes parafusadas deveriam ter ausência de quebra ou soltura do parafuso e as cimentadas não poderiam estar soltas. Foram excluídos pacientes fumantes, mulheres grávidas ou lactantes.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo 1). Todos os participantes foram esclarecidos sobre os propósitos do estudo e confirmaram sua aceitação mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

### 3.2 Procedimentos clínicos

O exame clínico foi realizado, por um único examinador treinado, tanto nos implantes quanto em um dente natural do indivíduo, com a utilização da sonda periodontal Plástica Colorvue PCVNCKIT6 (Hu-Friedy Mfg. Inc – Chicago, IL- EUA).

De acordo com critérios sugeridos por Albrektsson et al.<sup>6</sup>(1986) e modificados por Smith, Zarb <sup>98</sup>(1989) os implantes e dentes foram distribuídos da seguinte maneira: G I – implantes em condições de saúde, G II – implantes com peri-implantite, G III - dentes sadios dos pacientes com implantes sadios e G IV - dentes sadios dos pacientes com peri-implantite.

Uma ficha clínica específica (Anexo 3) foi utilizada para anotação dos seguintes parâmetros:

- ❖ índice de placa dicotomizado (IP) <sup>3</sup>;
- ❖ índice de sangramento marginal modificado (IG) <sup>60</sup>;
- ❖ profundidade de sondagem (PS) <sup>60</sup>;
- ❖ nível de inserção clínica (NI)<sup>60</sup>;
- ❖ sangramento à sondagem e/ou supuração ate 30 seg. após a sondagem (SS);
- ❖ presença ou ausência de mobilidade com dois instrumentos rombos;

- ❖ radiografia dos dentes e implantes selecionados, seguindo a técnica do paralelismo, utilizando filme do tipo Ektaspeed (Kodak, Eastman Co., USA) para evidenciar perda óssea radiográfica.

As análises clínicas foram realizadas em seis pontos (sítios) por implante/dente. O sítio com maior profundidade de sondagem foi selecionado para coleta do fluido crevicular.

O dente homólogo, em condições clínicas de saúde periodontal foi selecionado para comparação dos achados intra-grupo. No caso do dente homólogo estar com evidências clínicas de doença periodontal, estar ausente ou restaurado, o dente saudável mais próximo ao homólogo foi selecionado.

### 3.3 Coleta do fluido crevicular

A coleta do fluido crevicular, para os exames microbiológicos e imunológicos, foi realizada uma semana após os exames clínicos para evitar interferência devido à sondagem. Foram selecionados para a coleta os sítios periodontais e perimplantares com maior profundidade de sondagem. O sítio MV foi selecionado quando a sondagem era a mesma em todo o implante/ dente avaliado.

O sítio a ser coletado foi isolado com roletes de algodão ou gaze estéril e a placa supragengival foi removida. A região foi seca com jato de

ar e após 30 segundos o fluido crevicular gengival e perimplantar foram coletados.

Para a análise microbiológica a amostra foi coletada com cones de papel absorvente estéril. Os cones foram introduzidos no sulco/ bolsa periodontal/ perimplantar, em direção apical, até sentir uma pequena resistência e foram mantidos no local por 30 segundos. Os cones foram imediatamente colocados em tubos apropriados contendo 500µL de tampão TE (Tris pH 8,0 10mM, EDTA 1mM) e conservados a -20°C para posterior análise. A coleta para o exame imunológico foi realizada após um intervalo de aproximadamente 10 minutos para evitar interferência da primeira coleta <sup>76</sup>. Nesta coleta foi utilizado o periopaper e, os papéis visualmente contaminados com saliva e/ou sangue foram descartados. O volume de fluido coletado foi mensurado imediatamente após a coleta com o auxílio do Periotron 6000 (Oraflow Inc.). O valor determinado no Periotron 6000 foi transformado em unidade de volume (µL) com o auxílio do programa Periotron Professional (Oraflow Inc.) As amostras foram armazenadas em tubos apropriados contendo 200µL uma solução gelada de tampão fosfato salina – PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH 7,4) adicionado de albumina de soro bovina (BSA, 1mg/mL), antipaína (1µg/mL), aprotinina (1µg/mL), leupeptina (1µg/mL), N-ethylmaleimida (1mM) e N-Dodecyl-N, N-Dimethyl-3-Ammonio-1-propanesulfonato (50µg/mL)<sup>40</sup> e então conservadas a -20°C para posterior análise.



### 3.4 Coleta de células da mucosa bucal

Células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas para extração do DNA genômico dos indivíduos. As células foram obtidas a partir de bochecho por 1 minuto com solução de glicose a 3%, seguido de um raspado da mucosa bucal com uma espátula de madeira estéril. A espátula foi agitada no tubo contendo o bochecho e este centrifugado a 2.000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em 80uL de tampão de extração (Tris 10mM, pH7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%), e congeladas a - 20°C para posterior análise <sup>104</sup>.

### 3.5 Procedimentos laboratoriais

#### 3.5.1 Análise microbiológica

##### Preparo das amostras e reação de PCR

As amostras foram descongeladas em gelo e agitadas em vortex por um minuto. As amostras foram fervidas por 10 minutos e centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi colocado em um novo tubo contendo 100µL de TE e o restante novamente conservado a uma temperatura de -20°C. A extração do DNA bacteriano foi realizada com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

(25:24:1), seguida da precipitação com sal/etanol. O mesmo procedimento foi utilizado para purificação do DNA bacteriano a partir de uma cultura pura de cada espécie de interesse, para uso em controles positivos (gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Madalena Palomari Spolidório).

Inicialmente a presença de bactérias foi confirmada através de uma reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCycler<sup>TM</sup> thermal cycler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos e posteriormente os oligonucleotídeos específicos para cada espécie bacteriana listada na Tabela 1.

**Tabela 1**– Oligonucleotídeos para a identificação das espécies avaliadas

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado
Primer inespecífico*	5' GGACTAHAGGGTATCTAAT 3' 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'	700pb
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> **	5' AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC 3' 5' ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT 3'	557 pb
<i>Porphyromonas gingivalis</i> **	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb
<i>Prevotella intermedia</i> ***	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TAC ACA TCT CTG TAT CCT GCG T 3'	575 pb
<i>Prevotella nigrescens</i> **	5' TTA TGT TAC CCG TTA TGA TGG AAG 3' 5' ATG GCG AAA TAG GAA TGA AAG TTA 3'	1100 pb
<i>Tannerella forsythia</i> **	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb

\* Wilson et al.,<sup>109</sup> 1990;

\*\* Ashimoto et al.,<sup>8</sup> 1996

\*\*\*Guillot e Mouton,<sup>36</sup> 1997

H = C ou T

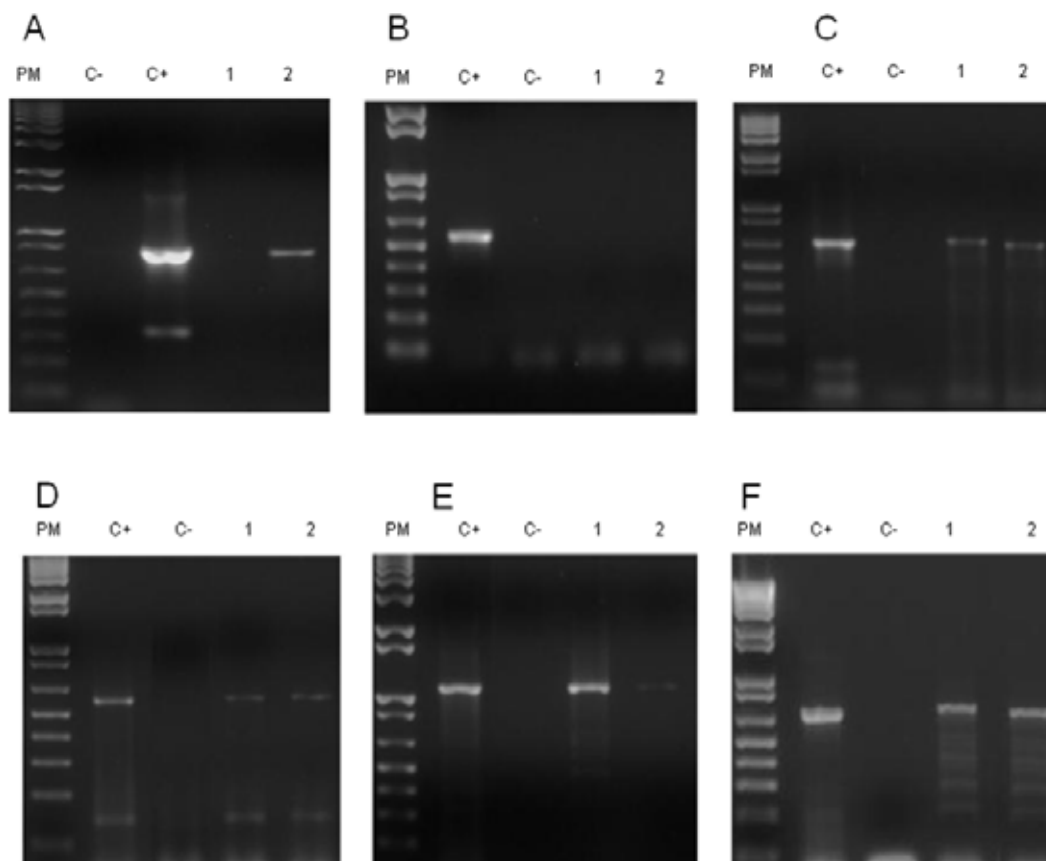
As reações de PCR foram otimizadas para cada bactéria utilizada. A reação de PCR foi realizada em volume total de 25µL, contendo 1µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>), 100µM de dNTPs (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>), de 1 a 2,5mM de Mg<sup>2+</sup> e, de 1 a 2 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>), conforme descrito na Tabela 2. Todas as reações foram realizadas na presença de um controle positivo,

contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e um controle negativo, sem DNA molde .

**Tabela 2**– Condições da reação de PCR para identificação bacteriana.

Primer	Condição da reação	Conc. Mg <sup>2+</sup>	Unid. Taq
Primer inespecífico	95 °C, 5min (1 ciclo); 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 94 °C, 30 seg, 55 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Prevotella intermedia</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 94 °C, 30 seg, 55 °C, 1min., 72 °C, 1minuto (36 ciclos)	1mM	2U
<i>Prevotella nigrescens</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 65 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	1mM	1,25U
<i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado com agarose ultra-pura (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>) e solução de TBE (Tris 1M; Acido bórico 0,9M; EDTA 0,5M), e adicionado de 0.5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>). Para a corrida eletroforética horizontal foi utilizado o sistema Horizon 11.14 (Life Technologies). Foram utilizados 12µL do produto de PCR e 2 µL de tampão de amostra (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>) para aplicação no gel. O gel foi submetido a uma corrente elétrica contínua de 100V por 90 minutos. Para documentação e análise, foi obtida imagem digitalizada do gel (Image Quant 100 – GE Healthcare). As fotografias obtidas foram armazenadas para posterior análise da presença das bactérias investigadas e podem ser observadas na Figura 1.

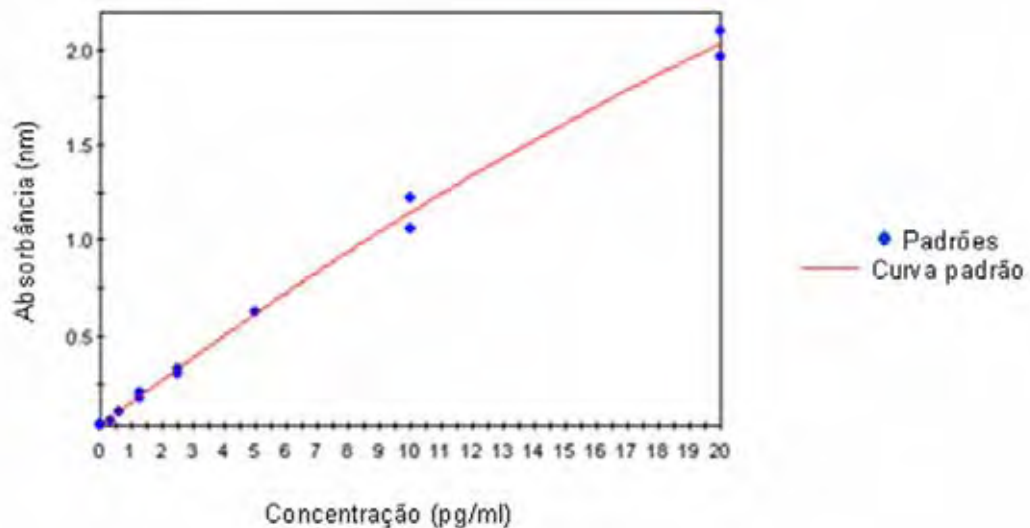


**FIGURA 1– Identificação bacteriana por PCR.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio evidenciando os produtos de PCR. A. primer inespecífico (700pb); B. primer para *A. actinomycetemcomitans* (557pb); C. primer para *P. gingivalis* (593pb); D. primer para *P.intermedia* (575pb); E. primer para *P.nigrescens* (1100pb); F. primer para *T.forsythia* (641pb). Em todos os painéis PM representa o padrão de tamanho molecular de 1kb plus (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>), C+ o controle positivo, C- o controle negativo e os números são as amostras dos pacientes.

### 3.5.2 Análise imunológica - Preparo das amostras e teste ELISA

As amostras do fluido coletado foram descongeladas em gelo, agitadas em vortex e centrifugadas por 15 segundos em máxima rotação.

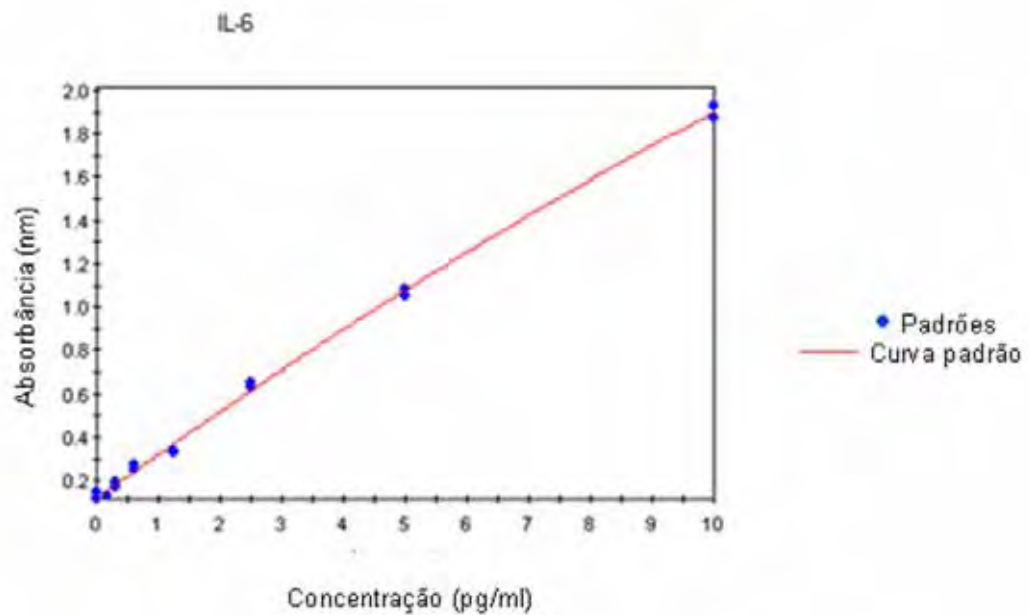
A quantificação da IL-1 $\beta$  foi realizada utilizando-se um kit enzimático para imunoenensaio ultra-sensível (ELISA), específico para a interleucina humana a ser avaliada (Hu IL-1 $\beta$  - BioSource International). O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram colocados nos poços 50 $\mu$ L de um tampão de incubação e em seguida 100 $\mu$ L dos padrões e amostras. Após incubação de 3 horas a placa foi lavada e o anticorpo secundário conjugado à biotina foi adicionado. A placa foi então incubada por mais 1 hora e, após lavagem a estreptoavidina-peroxidase foi adicionada. Após 30 minutos de incubação a placa foi novamente lavada, o revelador adicionado aos poços e a placa novamente incubada, por 30 minutos. A solução bloqueadora foi adicionada e a absorbância a 450nm aferida. As concentrações da IL-1 $\beta$  foram calculadas a partir de uma curva padrão (Figura 2) e normalizadas para o volume de fluido crevicular coletado.



**FIGURA 2**– Curva padrão de IL-1 $\beta$ .

A quantificação da IL-6 foi realizada com um kit enzimático para imunoenensaio ultra-sensível (ELISA) específico (Hu IL-6 - BioSource International). O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante de forma semelhante à descrita para a quantificação da IL-1 $\beta$ . As concentrações da IL-6 foram calculadas a partir de uma curva padrão (Figura 3) e normalizadas para o volume de fluido crevicular coletado.





**FIGURA 3**– Curva padrão de IL-6.

### 3.5.3 Avaliação dos polimorfismos por PCR/RFLP

A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) utiliza as alterações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA que criam ou destroem sítios para endonucleases de restrição, para identificar os diferentes alelos. Endonucleases de restrição são utilizadas para digestão dos produtos de PCR e o padrão de restrição é analisado.

As amostras contendo células da mucosa bucal foram descongeladas e incubadas durante uma noite com 100ng/mL de proteinase K (Invitrogen) a 37°C. O DNA foi então purificado utilizando-se a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), seguido da precipitação com sal/etanol. O DNA foi ressuscitado em 70µL de

tampão TE. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 - Thermo Electron Corporation), por meio da avaliação da absorbância a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm respectivamente<sup>103</sup>.

O DNA purificado foi utilizado como molde em uma reação de PCR, realizada em termociclador convencional (MyCycler™ thermal cycler - BioRad), utilizando oligonucleotídeos listados na Tabela 3.

**Tabela 3** Oligonucleotídeos e condições da reação de PCR

Gene	Oligonucleotídeo	Condição da reação
<i>IL1B</i> -511*	5' TGGCATTGATCTGGTTCATC 3' 5' GTTTAGGAATCTTCCCCTT 3'	95°C, 5 min (1ciclo); 95°C, 1 min.; 53°C, 1 min.; 72°C, 1 min (35 ciclos)
<i>IL1B</i> +3954*	5'CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA 3' 5' GCTTTTTTGTGTGAGTCCCG 3'	95°C, 5 min. (1ciclo); 95°C, 1 min.; 67,5 °C, 1 min.; 72°C, 1 min. (35 ciclos)
<i>IL6</i> -174**	5' CAGAAGAACTCAGATGACTGG 3' 5' GCTGGGCTCCTGGAGGGG 3'	95°C, 5 min. (1ciclo); 95°C, 1 min.; 60°C, 1 min.; 72°C, 1 min. (35 ciclos)

\* modificado de Kornman et al.<sup>43</sup>, 1997

\*\* modificado de Fishman, et al.<sup>25</sup>, 1998.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 50µL, contendo aproximadamente 700ng de DNA genômico, 1µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>), 200µM de dNTPs (Invitrogen) e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>). As condições de tempo e temperatura utilizados estão descritos na Tabela 3. A amplificação dos fragmentos foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.

A reação de digestão contendo 18µL do produto de PCR foi realizada com um volume final de 30µL. Para o polimorfismo *IL1B+3954*, 2U da enzima de restrição *Taq I* (New England BioLabs) foram utilizadas durante uma noite, a 67°C. Para o polimorfismo *IL1B-511* foram utilizados 3U da enzima *Ava I* (New England BioLabs), a 37 °C, durante uma noite. E, para a reação do gene *IL6* foi utilizado 1,2U da enzima de restrição *Nla III* (New England BioLabs), durante uma noite, a 37 °C.

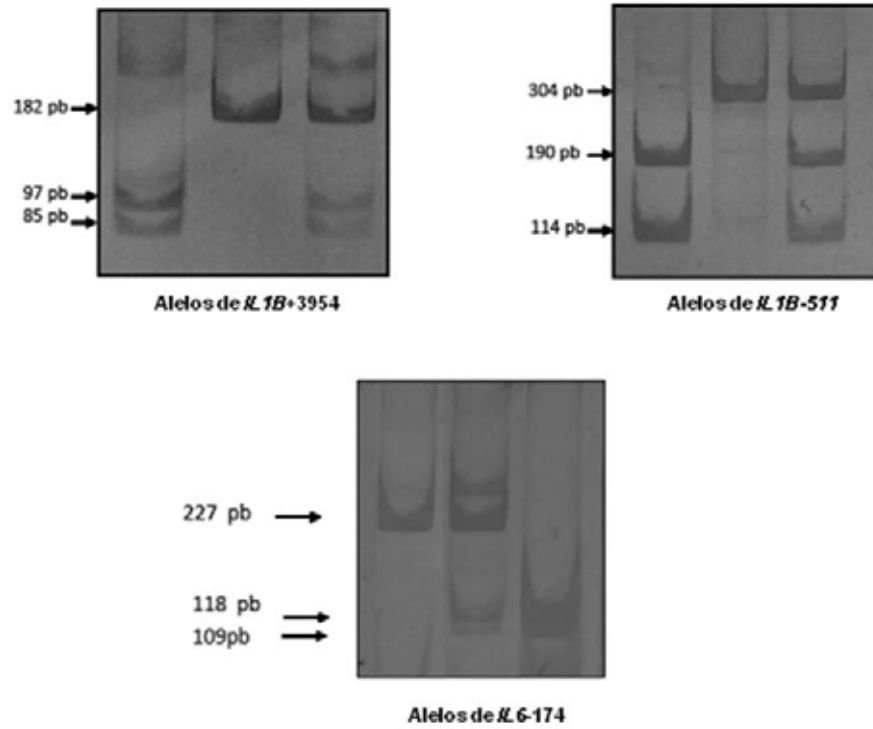
O produto do PCR/RFLP (18µL) foi adicionado de 4µL de tampão de amostra e submetido à eletroforese em gel de 8% de poliacrilamida (Figura 4). Para a visualização dos fragmentos de restrição o gel foi corado com nitrato de prata. O padrão de bandas esperado para os diferentes alelos está descrito na Tabela 4.

**Tabela 4-** Padrão de bandas esperado no PCR/RFLP

<b>Alelo</b>	<b>Tamanho das bandas</b>
<i>IL1B</i> -511*	Alelo C= 190pb + 114pb Alelo T= 304pb
<i>IL1B</i> +3954*	Alelo C= 12pb + 85pb + 97pb Alelo T= 12pb + 182pb
<i>IL6</i> -174**	Alelo G= 13pb+ 227pb + 59pb Alelo C= 13pb + 118pb+ 109pb

\*Kornman et al., <sup>43</sup>1997

\*\* Fishman, et al., <sup>25</sup>1998



**FIGURA 4**– PCR/RFLP. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata evidenciando os três polimorfismos estudados.

#### 3.5.4 Coloração por nitrato de prata

O gel foi submerso durante 10 minutos em solução fixadora (metanol 40%; formaldeído 13,5%) e lavado duas vezes, durante 5 minutos cada lado, com água. Em seguida o gel foi submerso em solução de tiosulfato 0,02% durante um minuto, e lavado duas vezes com água, por 20 segundos. O gel foi impregnado em solução de nitrato de prata 0,1% por um período de 10 minutos, e terminada a impregnação, foi enxaguado uma vez com água e uma vez com solução reveladora ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3%, formaldeído 0.05%,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  00,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O gel foi deixado na solução reveladora até que as bandas pudessem ser visualizadas. A reação foi então parada com uma solução de ácido cítrico 0,11M (Red Book Supplement II).

### 3.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística, utilizando-se softwares (*BioEstat 4.0* – BioEstat Software, Belém/PA, BRASIL e *Graph Pad Prism 5.0* GraphPad Software, Inc., San Diego/CA, USA) e foi considerado um nível de significância de 5%.

Para verificar a distribuição normal dos dados foi aplicado o Teste de Normalidade de D'Agostino. Na comparação entre os grupos G I e G II foram utilizados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney (para dados quantitativos) e Exato de Fisher (para dados categóricos). Na comparação entre dentes e implantes foram utilizados os testes não-paramétricos de Wilcoxon (para dados quantitativos) e Exato de McNemar (para dados categóricos).

A população estudada foi avaliada quanto ao Equilíbrio de Hard-Weinberg. As amostras foram consideradas independentes. Para avaliar as diferentes proporções genótípicas entre os grupos, foi utilizado o teste qui-quadrado. Para cada polimorfismo analisado, os grupos foram comparados quanto à presença do alelo positivo (alelo T para os polimorfismos *IL1B* e alelo G para o polimorfismo *IL6*) e a significância foi determinada pelo teste binomial.

*Resultado*



## 4 Resultado

A apresentação dos resultados deste trabalho será feita separadamente por objetivo específico de estudo.

### 4.1 Avaliação clínica dos implantes com pelo menos um ano sob função.

Participaram desse estudo 47 pacientes. Ao final do estudo a característica da amostra de acordo com o gênero e a idade apresentou-se da seguinte maneira: o grupo de pacientes com implantes sadios foi constituído de 31 pacientes, sendo 9 (29,04%) homens e 22 (70,66 %) mulheres com idades entre 26 e 71 anos, sendo a média das idades de 47,83 anos. O grupo de pacientes com perimplantite foi constituído de 16 pacientes, sendo 7 homens (43,75%) e 9 mulheres (56,25%) com idades entre 27 e 66 anos, de maneira que a idade média foi de 44,13 anos (Tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição de gênero e idade média dos pacientes estudados

	Feminino	Masculino	Idade média (anos)
Nº pacientes com implante sadio	22 (70,96%)	9 (29,04%)	47,83
Nº pacientes com perimplantite	9 (56,25%)	7 (43,75%)	44,13

Uma avaliação estatística do número da amostra foi realizada devido às dificuldades encontradas para a seleção dos pacientes. Para tanto, foi aplicado o teste de hipótese bicaudal nos resultados de PS obtidos no grupo com perimplantite para determinar o tamanho ideal de amostra. O desvio padrão obtido para esta amostra foi de 1,8mm. Determinamos a diferença a ser detectada em 1,3mm, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. O tamanho da amostra indicado pelo teste estatístico foi de 15 pacientes.

Um implante e um dente foram avaliados de cada paciente que participou deste estudo. Embora o exame clínico tenha sido feito em seis pontos por implante/dente para a análise dos resultados foram considerados os parâmetros do sítio que apresentou a maior profundidade de sondagem. Os valores originais obtidos nas avaliações dos fatores de variação: índice de placa, índice gengival, profundidade de

sondagem, recessão gengival, sangramento à sondagem e supuração, estão dispostos no Anexo 4.

Foram avaliados 47 implantes, sendo 31 em condições de saúde (G I) e 16 com perimplantite (G II) e 47 dentes, dos quais 31 estavam sadios e eram dos pacientes com implantes sadios (G III) e 16 dentes sadios dos pacientes com perimplantite (G IV).

Para verificar a distribuição normal dos dados foi aplicado o Teste de Normalidade de D'Agostino. Os dados clínicos avaliados não se ajustaram à distribuição normal, portanto, na comparação entre G I (n=31) e G II (n=16) foram utilizados os testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Exato de Fisher. A comparação entre os parâmetros clínicos do G I com o G II está descrita na Tabela 6.

**Tabela 6 – Comparação dos parâmetros clínicos entre G I e G II**

Variáveis	Grupos de Implantes		Diferença entre grupos
	G I	G II	
IP(%)**	25,81	18,75	$p=0,7252$
IG(%)**	9,68	25	$p=0,2083$
SS(%)**	0	100	$p=0,0001^*$
SUP (%)**	0	25	$p=0,0102^*$
PS(mm)***	3,90±2,10	5,30±1,80	$p=0,0255^*$
NG(mm)***	0,30±0,70	0,40±1,30	$p=0,8663$
NI(mm)***	4,20±2,10	5,60±2,20	$p=0,0329^*$

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*\* Teste Exato de Fisher;

\*\*\*Teste de Mann-Whitney

Quando comparamos os parâmetros clínicos entre G I e G II observamos que não existem diferenças entre os grupos para o índice de placa, índice gengival e nível de inserção ( $p > 0,05$ ). O sangramento à sondagem estava presente em 100% dos sítios avaliados no G II enquanto que no G I nenhum dos sítios apresentava sangramento à sondagem ( $p=0,0001$ ). Supuração estava presente em 25% dos sítios do G II e em nenhum sítio do G I ( $p=0,0102$ ). A profundidade de sondagem ( $p=0,0255$ ) e o nível de inserção ( $p=0,0329$ ) estão cerca de 1,3mm maiores no G II quando comparados ao G I e, o nível gengival não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p=0,8663$ ).

Para a comparação entre implante e dente presentes no mesmo paciente, ou seja, entre G I e G III e entre G II e G IV foram utilizados os testes não-paramétricos de Wilcoxon e Exato de Mc Nemar. As Tabelas 7 e 8 apresentam as comparações clínicas entre os dentes e implantes avaliados no mesmo paciente.

**Tabela 7 – Comparação dos parâmetros clínicos entre G I e G III**

Variáveis	Grupos		Diferença entre grupos
	G I	G III	
IP(%)**	25,81	12,9	$p=0,6171$
IG(%)**	9,68	3,23	$p=0,6171$
SS(%)**	0	0	$p=1,0000$
SUP (%)**	0	0	$p=1,0000$
PS(mm)***	3,90±2,10	2,50±0,60	$p=0,0020^*$
NG(mm)***	0,30±0,70	0,20±0,60	$p=0,4185$
NI(mm)***	4,20±2,10	2,70±1,00	$p=0,0012^*$

\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*\* Teste Qui-quadrado;

\*\*\*Teste de Wilcoxon.

A comparação do G I com G III apresentou diferença estatisticamente significativa apenas para os parâmetros profundidade de sondagem ( $p=0,0020$ ) e nível de inserção ( $p=0,0012$ ). Para os dois parâmetros o grupo G I apresenta um aumento de aproximadamente 1,5mm em relação ao G III.

**Tabela 8** – Comparação dos parâmetros clínicos entre G II e G IV

Variáveis	Grupos		Diferença entre grupos
	G II	G IV	
IP(%)**	18,75	6,25	$p=0,4795$
IG(%)**	25	0	$p=0,1336$
SS(%)**	100	0	$p=0,0002^*$
SUP (%)**	25	0	$p=0,1336$
PS(mm)***	5,30±1,80	2,40±0,60	$p=0,0010^*$
NG(mm)***	0,40±1,30	0,50±1,20	$p=0,8551$
NI(mm)***	5,60±2,20	2,90±1,50	$p=0,0010^*$

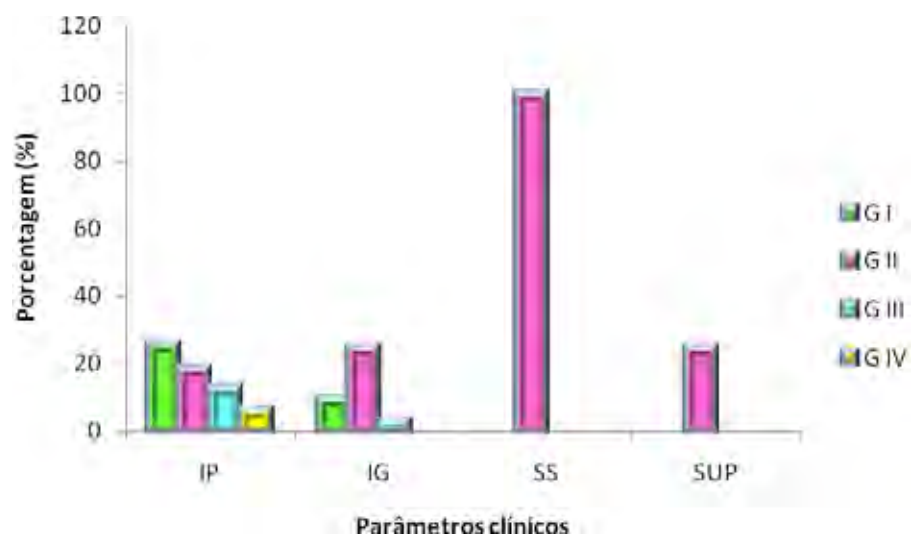
\*Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

\*\* Teste Mc Nemar;

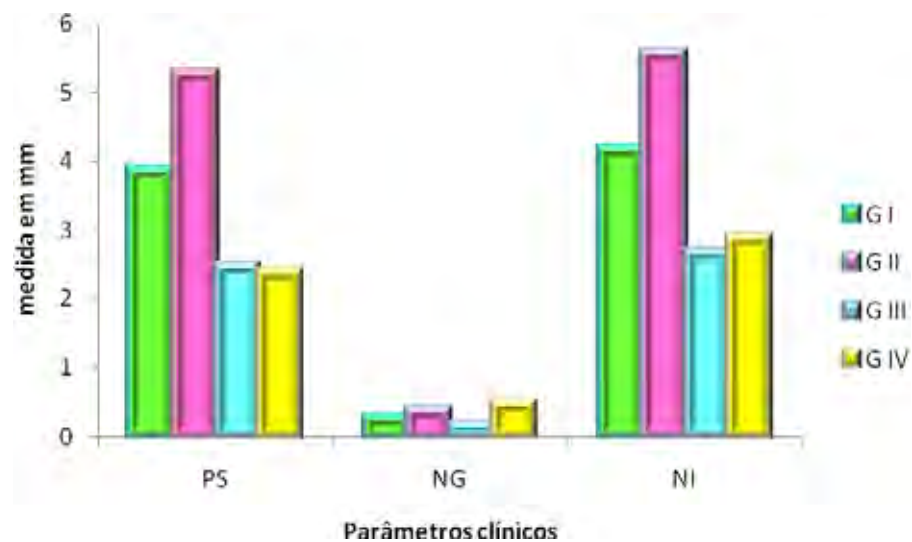
\*\*\*Teste de Wilcoxon.

A comparação dos parâmetros avaliados entre G II e G IV foi significativa para sangramento à sondagem ( $p=0,0002$ ) profundidade de sondagem ( $p=0,0010$ ) e nível de inserção ( $p=0,0010$ ) de forma que a PS é cerca de 2,2mm maior no G II e o nível de inserção cerca de 1,9mm maior.

Para uma melhor visualização dos parâmetros clínicos avaliados nos grupos deste estudo, os dados categóricos estão ilustrados na Figura 5 e os dados quantitativos na Figura 6.



**FIGURA 5**– Distribuição dos dados categóricos avaliados nos grupos G I, G II, G III e G IV.

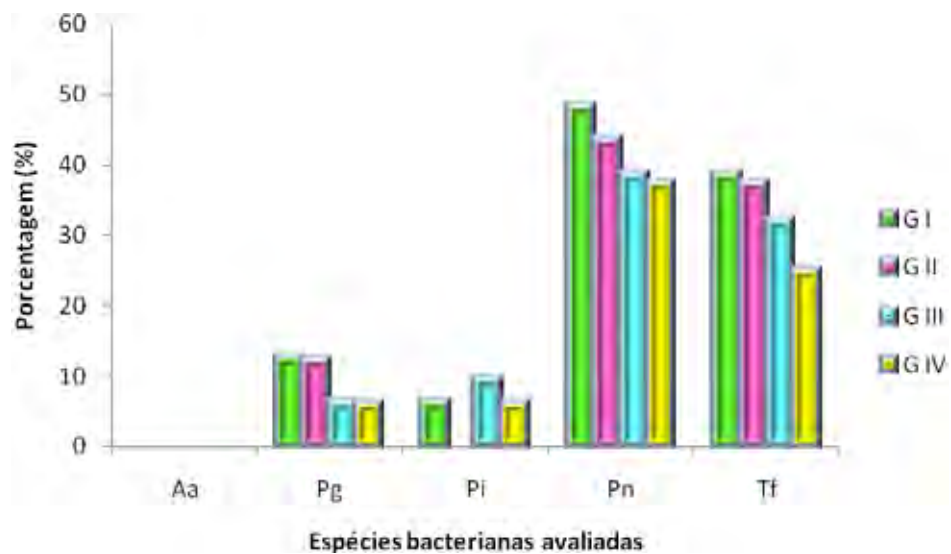


**FIGURA 6**– Distribuição dos dados quantitativos avaliados nos grupos G I, G II, G III e G IV.

#### 4.2 Identificação das bactérias presentes nos sítios perimplantares.

A amostra de fluido crevicular coletado dos sítios selecionados foi utilizada para identificação dos microrganismos: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. Forsythia*. A distribuição das bactérias nos sítios avaliados está apresentada na Figura 7.





**FIGURA 7**– Distribuição dos sítios com presença de bactérias.

Das cinco bactérias avaliadas neste estudo apenas o *A. actinomycetemcomitans* (Aa) não foi detectado em nenhum dos sítios avaliados, tanto nos implantes quanto nos dentes. O Pi também não foi encontrado nos implantes com perimplantite, apesar de estar presente nos outros grupos. Todas as demais bactérias avaliadas foram encontradas tanto nos implantes quanto nos dentes.

A comparação da presença das bactérias entre G I e G II demonstrou uma proporção bastante semelhante, de maneira que, para todas as bactérias estudadas, não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). A distribuição das bactérias nos grupos G I e G II estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Comparação da presença de bactérias entre G I e G II

Variáveis	Grupos de Implantes		Diferença entre grupos
	G I	G II	
<i>Aa</i> (%)*	0	0	$p=1,0000$
<i>Pg</i> (%)*	12,9	12,5	$p=1,0000$
<i>Pi</i> (%)*	6,45	0	$p=0,5412$
<i>Pn</i> (%)*	48,39	43,75	$p=1,0000$
<i>Tf</i> (%)*	38,71	37,5	$p=1,0000$

\* Teste Exato de Fisher

A espécie que apresentou maior prevalência foi o Pn, no entanto foi encontrada em proporção semelhante nos implantes sadios e com perimplantite, não havendo diferença na distribuição da espécie quando os grupos foram comparados ( $p=1,00$ ). A proporção encontrada do Pg foi praticamente a mesma nos dois grupos de implantes avaliados, 12,9% nos implantes sadios e de 12,5% nos implantes com perimplantite ( $p=1,00$ ). A comparação entre Pi e Tf também não demonstrou diferença entre os grupos avaliados ( $p=1,00$ ).

As comparações entre G I e G III e, entre G II e G IV também não apresentaram diferenças nas distribuições das espécies bacterianas e podem ser observadas nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10** – Comparação da presença de bactérias entre G I e G III

Variáveis	Grupos de Implantes		Diferença entre grupos
	G I	G III	
<i>Aa</i> (%)*	0	0	$p=1,0000$
<i>Pg</i> (%)*	12,9	6,45	$p=0,6171$
<i>Pi</i> (%)*	6,45	9,68	$p=1,0000$
<i>Pn</i> (%)*	48,39	38,71	$p=0,5050$
<i>Tf</i> (%)*	38,71	32,26	$p=0,7518$

Teste Exato de Mc Nemar

Embora a diferença na proporção encontrada para *Pg* tenha sido duas vezes maior no grupo G I quando comparado ao G III, não foi estatisticamente significativa ( $p=0,6171$ ). Para as demais bactérias, observamos diferenças nas proporções encontradas nos grupos, no entanto, estatisticamente não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 11** – Comparação da presença de bactérias entre G II e G IV

Variáveis	Grupos de Implantes		Diferença entre grupos
	G II	G IV	
<i>Aa</i> (%)*	0	0	$p=1,0000$
<i>Pg</i> (%)*	6,45	6,25	$p=1,0000$
<i>Pi</i> (%)*	9,68	6,25	$p=1,0000$
<i>Pn</i> (%)*	38,71	37,5	$p=1,0000$
<i>Tf</i> (%)*	32,26	25	$p=0,6831$

\* Teste Exato de Mc Nemar

Na comparação entre o G II e GIV observamos que para *Pg* a diferença é duas vezes maior no G II e esta não é estatisticamente significativa ( $p=1,00$ ). Para as demais bactérias, excluindo o *Aa*, houve diferença nas proporções encontradas entre os grupos, porém estatisticamente estas diferenças não foram significantes ( $p > 0,05$ ).

4.3 Avaliação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 presentes no fluido crevicular.

Neste estudo, a análise da concentração de IL-1 $\beta$  e IL-6 entre os grupos foi realizada com a média das concentrações de cada grupo (Tabela 12). Para IL-1 $\beta$  o grupo G I apresentou uma média de  $2,04 \pm 2,74$  pg/mL enquanto que o grupo G II apresentou uma média de  $3,88 \pm 5,82$

pg/mL. A média da concentração de IL-1 $\beta$  no grupo G II foi cerca de 1,9 vezes maior que no grupo G I. No entanto, essa diferença não foi significativa ( $p=0,4062$ ). A avaliação da concentração de IL-1 $\beta$  do grupo G III apresentou uma média de  $3,47\pm 4,32$  pg/mL, não havendo diferença quando comparado ao grupo G I ( $p=0,0745$ ). O grupo G IV apresentou uma média de  $1,67\pm 1,59$  pg/mL e não apresentou diferença quando comparado ao grupo G I ( $p=0,0703$ ).

**Tabela 12**– Concentração de IL-1 $\beta$  e IL-6 (média  $\pm$  SD).

	G I	G II	G III	G IV	Valor de $p^{\neq}$
IL - 1 $\beta$ (pg/mL)					0,4062 <sup>A*</sup>
	2,04 $\pm$ 2,74	3,88 $\pm$ 5,82	3,47 $\pm$ 4,32	1,67 $\pm$ 1,59	0,0745 <sup>B**</sup>
					0,0703 <sup>C**</sup>
IL - 6 (pg/mL)					0,6534 <sup>A*</sup>
	0,32 $\pm$ 0,59	0,35 $\pm$ 0,48	0,25 $\pm$ 0,35	0,63 $\pm$ 1,20	0,7869 <sup>B**</sup>
					0,7764 <sup>C**</sup>

\* Teste de Mann-Whitney;

\*\*Teste de Wilcoxon;

<sup>A</sup> G I x G II; <sup>B</sup> G I x G III; <sup>C</sup> G II x G IV

Para IL-6 o grupo G I apresentou uma média de  $0,32\pm 0,59$  pg/mL, enquanto que o grupo G II apresentou uma média de  $0,35\pm 0,48$  pg/mL, não havendo diferença estatística entre os grupos. A avaliação da

concentração de IL-6 do grupo G III apresentou uma média de  $0,25 \pm 0,35$  pg/mL, não havendo diferença quando comparado ao grupo G I ( $p=0,7869$ ). O grupo G IV apresentou uma média de  $0,63 \pm 1,20$  pg/mL e não apresentou diferença quando comparado ao grupo G I ( $p=0,7764$ ).

#### 4.4 Identificação dos polimorfismos dos genes *IL1B* e *IL6*.

Comparações entre os paciente do GI e GII para os diferentes alelos e genótipos foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado. A população avaliada neste estudo encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três polimorfismos avaliados ( $p>0,05$ ).

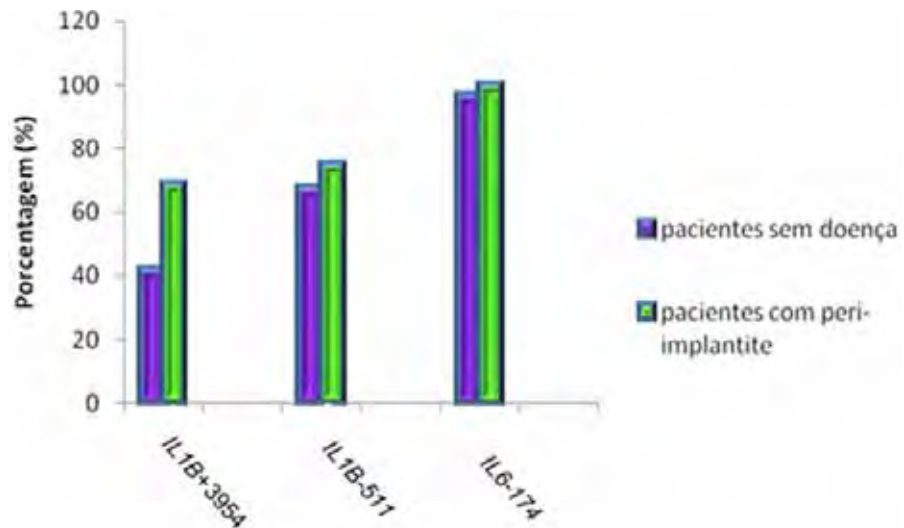
A distribuição alélica para o polimorfismo *IL1B* +3954, nos pacientes com implantes sadios e com perimplantite, apresentou maior proporção do alelo C quando comparado ao alelo T, porém sem diferença significativa ( $p=0,2156$ ). O genótipo mais freqüente nos pacientes com implantes sadios foi o homocigoto para o alelo C (58%) enquanto que, nos pacientes com perimplantite o genótipo heterocigoto foi o que apresentou maior proporção (56,25%). No entanto, a distribuição dos três diferentes genótipos para este polimorfismo não demonstrou diferenças nas proporções encontradas (Tabela 13). A avaliação do alelo T no polimorfismo *IL1B* +3954 não demonstrou relação, pelo teste binomial, deste alelo com a condição de doença ( $p=0,0814$ ) (Figura 8). Para o polimorfismo *IL1B* -511 a distribuição alélica não demonstrou predominância entre os possíveis alelos ( $p>0,05$ ). O genótipo heterocigoto foi o mais freqüente tanto para os pacientes com implantes sadios quanto

para os com perimplantite, porém a distribuição genotípica não apresentou diferença na proporção encontrada (Tabela 13). Também não foi encontrada relação entre a presença do alelo T neste polimorfismo e a condição de doença (Figura 8).

**Tabela 13**– Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de *IL1B*

	Pacientes sem doença (n=31)	Pacientes com perimplantite (n=16)	$\chi^2$	Valor de p
<b>Alelos <i>IL1B</i> +3954</b>				
<b>Alelo C</b>	46 (74,2%)	19 (59,37%)	2,173	0,2156
<b>Alelo T</b>	16 (25,8%)	13 (40,63%)		
<b>Genótipos <i>IL1B</i> +3954</b>				
<b>C / C</b>	18 (58%)	5 (31,25%)	3,076	0,1542
<b>C / T</b>	10 (32,25%)	9 (56,25%)		
<b>T / T</b>	3 (9,75%)	2 (12,5%)		
<b>Alelos <i>IL1B</i> -511</b>				
<b>Alelo C</b>	38 (61,3%)	18 (56,25%)	0,223	0,8025
<b>Alelo T</b>	24 (38,7%)	14 (43,752%)		
<b>Genótipos <i>IL1B</i> -511</b>				
<b>C / C</b>	10 (32,3%)	4 (25%)	0,9295	0,2230
<b>C / T</b>	18 (58%)	10 (62,5%)		
<b>T / T</b>	3 (9,7%)	2 (12,5%)		

n= número de pacientes



**FIGURA 8**– Distribuição dos pacientes com presença do alelo positivo para cada genótipo estudado (Teste Binomial de Distribuição de Probabilidades).

A distribuição alélica para o polimorfismo *IL6-174*, nos pacientes com implantes sadios e com perimplantite, apresentou maior proporção do alelo G quando comparado ao alelo C, porém sem diferenças entre a condição de saúde e doença ( $p=0,8368$ ). O genótipo mais freqüente tanto nos pacientes com implantes sadios quanto nos pacientes com perimplantite foi o homozigoto para o alelo G (67,77% e 56,25%, respectivamente). No entanto, as distribuições genóticas para este polimorfismo não demonstraram diferenças nas proporções encontradas (Tabela 14).



**Tabela 14**– Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo *IL6*.

	<b>Pacientes sem doença (n=31)</b>	<b>Pacientes com perimplantite (n=16)</b>	$\chi^2$	<b>Valor de p</b>
<b>Alelos <i>IL6-174</i></b>				
<b>Alelo C</b>	11 (17,75%)	7 (21,87%)	0,233	0,8368
<b>Alelo G</b>	51 (82,25%)	25 (78,13%)		
<b>Genótipos <i>IL6-174</i></b>				
<b>C / C</b>	1 (3,22%)	0 (0%)	0,847	0,6387
<b>G / C</b>	9 (29%)	7 (43,75%)		
<b>G / G</b>	21 (67,77%)	9 (56,25%)		

n= numero de pacientes.

O polimorfismo *IL6-174* não apresentou relação entre a presença do alelo positivo (alelo G) e a condição de doença (Figura 8).

*Discussão*

## 5 Discussão

A discussão dos resultados apresentados neste trabalho será dividida em duas partes. Na primeira parte serão discutidos os resultados clínicos e microbiológicos e, na segunda parte serão discutidos os resultados imunológicos e genéticos.

### 5.1 Parte I

A análise dos resultados apresentados neste trabalho apontou mensurações clínicas menos favoráveis no grupo que apresentava doença perimplantar.

A presença de sangramento à sondagem nos dentes é um indicador da presença de um processo inflamatório gengival <sup>33,45,95</sup>. Este sangramento também pode ser avaliado nos implantes e foi sugerido como um parâmetro preciso de diagnóstico <sup>54</sup>. Neste estudo, o sangramento à sondagem estava presente em todos os sítios avaliados do grupo G II e, em nenhum sítio dos demais grupos avaliados. Em uma avaliação dos parâmetros clínicos de implantes osseointegrados, Fransson et al <sup>26</sup>(2008) observaram maior sangramento à sondagem em implantes com história de perda óssea. Em contraste, em estudo semelhante Roos-Jansaker et al. <sup>89</sup>(2006) não encontraram relação entre a perda óssea ao redor dos implantes e sangramento à sondagem.

É sugerido que a extensão da sondagem em um dente sadio seja semelhante à de um implante em condição de saúde. No entanto, nos

sítios inflamados é possível que ocorra uma maior penetração da sonda nos implantes do que nos dentes<sup>26</sup>. Neste estudo observou-se uma maior profundidade de sondagem nos implantes do grupo G II quando comparados aos implantes do grupo G I e aos dentes do grupo G IV ( $p < 0,05$ ). O grupo G II apresentou uma profundidade de sondagem cerca de 1,3mm maior que o GI e cerca de 2,2mm maior que o grupo G IV. Essa diferença entre os grupos já era esperada pois, estamos comparando um grupo com doença, com grupos saudáveis.

A validade da sondagem nos implantes foi avaliada, em cães, por Lang et al.<sup>45</sup>(1994). Foram feitas sondagens com força de 2N e o exame histológico mostrou uma maior penetração da sonda nos sítios inflamados. Os autores sugerem que a sondagem ao redor dos implantes é uma boa técnica para verificar a condição de saúde ou doença dos implantes. Em complementaridade, Schou et al.<sup>95</sup>(2002) utilizaram um modelo experimental comparável ao apresentado por Lang et al.<sup>45</sup>(1994) e, demonstraram que a PS é maior na perimplantite quando comparada à saúde e mucosite.

Apesar do grupo G I não apresentar características de doença sua profundidade de sondagem é cerca de 1,5mm maior que o grupo G III. Este aumento pode ser decorrente das diferenças nas características microscópicas da interface dente/osso e implante/osso. Nos implantes a ausência de fibras periodontais de inserção resulta em um selamento biológico dependente apenas da capacidade adesiva do epitélio juncional

<sup>70,103</sup>, podendo resultar em uma maior profundidade de sondagem nos implantes quando comparados com dentes nas mesmas condições clínicas.

A profundidade de sondagem é importante para detecção de sítios que apresentam perda óssea <sup>26</sup>. Em nosso estudo observamos uma PS média de 6mm no grupo GII, evidenciando a maior perda óssea deste grupo. Mombelli et al. <sup>62</sup>(1987) compararam a PS em implantes com e sem perda óssea e observaram que a PS varia de 6 a 12mm nos implantes que apresentam perda óssea. Embora a PS encontrada por Hultin et al <sup>38</sup>(2002) nos implantes com perda óssea marginal tenha sido menor (PS=4,3mm), também estava relacionada à maior perda óssea nos implantes.

A ocorrência de perimplantite sugere que os implantes nesta condição apresentam perda óssea contínua e portanto devem apresentar maior recessão gengival quando comparados aos implantes sadios <sup>26</sup>. No entanto, em nosso estudo não encontramos diferenças entre o índice NG dos grupos G I e G II. Apse et al<sup>7</sup>(1991) em um acompanhamento longitudinal de implantes por 9 anos observaram um aumento contínuo na recessão perimplantar de cerca de 2mm. Em um acompanhamento de 2 anos, Bengazi et al. <sup>11</sup>(1996) observaram que a maior migração gengival ocorre durante os primeiros 6 meses e diminui significativamente nos 18 meses subsequentes. Estes autores sugerem que a recessão gengival no tecido perimplantar é resultado de uma remodelação do tecido mole na

tentativa de estabelecer uma dimensão biológica adequada. Neste estudo, os implantes avaliados estavam em função a pelo menos 12 meses, portanto, o tecido mole ao redor dos implantes já está estabelecido e estabilizado.

A placa bacteriana é um fator etiológico intimamente relacionado à perda de implantes e, é um iniciador dos eventos patológicos semelhantes aos observados na doença periodontal <sup>103</sup>. Logo após a exposição dos implantes à cavidade bucal uma microbiota subgingival é estabelecida <sup>27,106</sup>. A avaliação de implantes e dentes em pacientes parcialmente desdentados tem demonstrado que a microbiota nos implantes e dentes são semelhantes<sup>2,30,85</sup>, sugerindo que os microrganismos podem ser transmitidos dos dentes para os implantes<sup>13,27,46,63,90,100</sup>. No entanto, ainda não está esclarecida a diferença entre as bactérias que possam estar aderidas à superfície do implante e as presentes no fluido gengival <sup>27</sup>.

Neste estudo, para avaliação da microbiota presente no fluido gengival foi utilizado o teste de reação de polimerase em cadeia (PCR). A técnica de PCR tem sido amplamente aplicada em estudos para a detecção de microrganismos. Dessa forma, esta técnica foi escolhida para a análise microbiológica devido à sua facilidade de realização, baixo custo, pelo fato de demonstrar um excelente limite de detecção, e uma alta especificidade para a maioria das bactérias como o *A. actinomycetemcomitans* e a *P. gingivalis* <sup>17</sup>.

Neste estudo, das cinco bactérias avaliadas no fluido gengival o Aa não foi encontrado em nenhum sítio avaliado. Além do Aa, o Pi também não foi encontrado nos implantes com perimplantite. Todas as demais bactérias avaliadas foram encontradas tanto nos implantes quanto nos dentes. Porém, não foram encontradas diferenças na prevalência das bactérias estudadas entre os grupos avaliados.

Leonhardt et al.<sup>48</sup>(1999) sugerem que não apenas as bactérias comumente relacionadas à doença periodontal podem estar associadas à perimplantite. Estes autores avaliaram a microbiota em implantes com doença e também encontraram estafilococos, espécies entéricas e fungos. Estes achados suportam a idéia de que uma microbiota complexa é associada à infecção dos tecidos ao redor dos implantes. Botero et al.<sup>13</sup> (2005) avaliaram a microbiota ao redor de implantes com doença e encontraram uma maior quantidade de periodontopatógenos quando comparados aos implantes saudáveis e dentes vizinhos aos implantes doentes. Os autores encontraram uma maior proporção de Pn nos implantes com doença quando comparados aos saudáveis. Ainda, uma relação entre a presença de Pg nos dentes e nos implantes, suportando a idéia de que o dente natural pode servir como reservatório bacteriano, permitindo uma transmissão entre os sítios e conseqüentemente uma infecção perimplantar. Além de bactérias periodontopatogênicas, os autores encontraram altos índices de microrganismos não comuns a cavidade oral, tais como bastonetes entéricos gram-negativos. Em

complementaridade, Salvi et al.<sup>91</sup>(2008) avaliaram a microbiota de dentes e implantes e encontraram similaridade entre os periodontopatógenos encontrados nos dentes e implantes avaliados. Os autores concluem ainda, que a prevalência de espécies como *Fusobacterium* e *Streptococcus*, *P. micos* e *S. aureus* foi maior do que as espécies bacterianas normalmente associadas à doença periodontal.

A semelhança na prevalência encontrada entre as bactérias estudadas nos diferentes grupos sugere que em um mesmo indivíduo, parcialmente desdentado, as características microbiológicas encontradas nos dentes e implantes são bastante semelhantes. Essa similaridade deve ser em decorrência do período pelo qual os implantes estão em função. De maneira que, ocorreu um equilíbrio entre a microbiota presente nos dentes e implantes de um mesmo paciente. Como a perimplantite uma doença que apresenta como fator etiológico primário a placa bacteriana e a complexidade dos tipos bacterianos relacionados ao processo de doença, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de elucidar a relação de bactérias que não são normalmente relacionadas a doença periodontal.



## 5.2 Parte II

A avaliação da concentração de IL-1 $\beta$  e de IL-6 no fluido dos dentes e implantes avaliados neste estudo foi realizada utilizando os valores das médias das concentrações de cada grupo.

A análise da concentração de IL-1 $\beta$  nos grupos mostrou que apesar de o GII ter cerca de 1,9 vezes mais interleucina que o GI, essa diferença não é significativa. Este resultado pode ser uma consequência do desvio padrão muito elevado. As demais comparações para esta citocina também não demonstraram diferença entre os grupos, demonstrando uma semelhança no padrão imunológico periodontal e perimplantar. Em concordância aos nossos achados, Lachmann et al.<sup>44</sup>(2007) não encontraram diferenças no padrão imunológico para IL-1 $\beta$  em resposta à perimplantite quando comparado a implantes sadios. Hultin et al.<sup>38</sup>(2002) também não observaram relação entre a concentração de IL-1 $\beta$  e a doença perimplantar. Concentrações semelhantes foram encontradas tanto nos implantes sadios quanto nos com doença e, segundo os autores, estes achados podem ser reflexo de uma infecção crônica marginal de progressão lenta e não de uma doença ativa.

Panagakos et al.<sup>75</sup>(1996) buscaram correlacionar a concentração de IL-1 $\beta$ , em 13 pacientes, com implantes sadios, doença precoce ou com perimplantite avançada e demonstraram a presença desta citocina em todas as condições clínicas avaliadas. Os autores relacionam a maior concentração de IL-1 $\beta$  aos implantes com doença de acometimento

precoce devido à natureza aguda desta infecção quando comparada a natureza crônica da perimplantite avançada.

A observação de que a concentração da IL-1 $\beta$  no fluido crevicular gengival aumenta de acordo com o grau de severidade da doença (saúde, mucosite e perimplantite), sugere que esta citocina está relacionada à rápida e ampla destruição do tecido de suporte observado durante o processo de doença, como também sugere sua atuação como um indicador para o monitoramento da saúde/doença em implantes osseointegrados<sup>9,41,66,75</sup>. A concentração aumentada de IL-1 $\beta$  nos sítios com perda óssea ao redor tanto de dentes quanto de implantes pode representar um fator relacionado ao paciente e sua modulação ao processo inflamatório<sup>56</sup>.

Murata et al.<sup>66</sup>(2002) avaliaram implantes em condições de saúde, com mucosite e com perimplantite e, para controle utilizaram dentes em condições de saúde. Os autores verificaram uma maior concentração de IL-1 $\beta$  em implantes com perimplantite quando comparados aos com mucosite e sadios e a concentração de IL-1 $\beta$  entre os implantes sadios e os dentes sadios não demonstrou diferença. Os autores acreditam que este resultado suporta a idéia de que a IL-1 $\beta$  possa ser a primeira citocina a estimular a reabsorção óssea.

Da mesma maneira que a IL-1 $\beta$ , a IL-6 é um mediador do processo inflamatório e pode ser associada à doença periodontal<sup>28-29,59,79</sup>. Altas concentrações desta citocina podem ser induzidas pela presença de

periodontopatógenos <sup>55</sup> e apresentam importante função na diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, além de, induzir o crescimento e diferenciação de células B e osteoclastos <sup>64</sup>.

Em nosso estudo, a análise dos resultados para a concentração de IL-6 mostrou que as concentrações encontradas entre os grupos avaliados eram bastante semelhantes não havendo diferença estatística entre eles.

Moreira et al. <sup>64</sup>(2007) avaliaram a expressão da IL-6 em células do sangue periférico de pacientes com doença periodontal e observaram que a doença periodontal pode levar a uma alteração na concentração sistêmica desta citocina, tendo associado o grau de severidade da doença com níveis aumentados de IL-6. Em complementaridade a estes achados, D'Aiuto et al. <sup>19</sup>(2004) relacionaram altos níveis de IL-6 no soro de pacientes com doença periodontal.

Diferenças individuais na resposta inflamatória e imunológica à infecção bacteriana podem influenciar a suscetibilidade do hospedeiro à doença <sup>74</sup>. A cascata de mediadores inflamatórios do hospedeiro em resposta à infecção bacteriana pode ser determinada por fatores genéticos e resultar em destruição de tecido conjuntivo e ósseo <sup>67</sup>. Em nosso estudo avaliamos variações no genoma por meio da análise de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – single nucleotide polymorfism).

Os genes que codificam para as diferentes citocinas têm significativo papel no controle dos mecanismos da resposta imune, por isso os SNPs destes genes vêm sendo amplamente estudados<sup>101</sup>. O polimorfismo *IL1B*+3954 ocorre com a troca da citosina por timina. A presença do alelo positivo, alelo T, tem sido relacionada à condição de doença<sup>42</sup>. O polimorfismo *IL1B*-511 ocorre com a troca da citosina por uma timina e o alelo T é denominado alelo positivo. No polimorfismo *IL6*-174 ocorre a troca da guanina por uma citosina. A presença do alelo, alelo G, tem sido relacionada à doença periodontal<sup>105</sup>. Kornman et al.<sup>43</sup>(1997) demonstraram que os maiores níveis de IL-1 $\beta$  estão relacionados à presença do alelo T, na posição +3954, em pacientes não fumantes com doença periodontal. Assim a presença do alelo T em pacientes com doença pode levar a maior produção de IL-1 $\beta$  em resposta ao processo inflamatório instalado.

Em nosso estudo, o alelo C foi mais frequente para o polimorfismo *IL1B*+3954, tanto para os pacientes com implantes sadios quanto para os pacientes com perimplantite. No entanto, não foram encontradas diferenças significantes. Da mesma forma, na avaliação dos genótipos identificamos o genótipo homozigoto para o alelo C como o mais frequente entre os pacientes com implantes sadios e o genótipo heterozigoto como o mais frequente para o grupo de pacientes com implantes doentes. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas. A avaliação do alelo T na população estudada neste trabalho

não demonstrou uma relação deste alelo com a condição de doença. Shimpuku et al.<sup>96</sup>(2003) avaliaram o polimorfismo genético para a IL-1, em implantes com perda óssea precoce e idiopática e compararam a controles sem perda óssea. Os autores não encontraram diferenças na distribuição dos genótipos para *IL1B+3954* entre os grupos avaliados. De forma semelhante, Campos et al.<sup>15</sup>(2005) buscaram correlacionar o polimorfismo genético de *IL1B* com a perda precoce de implantes osseointegrados, em pacientes não fumantes, e não encontraram associação deste tipo de perda com a presença do alelo T no polimorfismo *IL1B+3954*.

Para o polimorfismo *IL1B-511*, a distribuição alélica também não demonstrou predominância entre os possíveis alelos. O genótipo heterozigoto foi o mais frequente tanto para os pacientes com implantes sadios quanto para os com perimplantite, porém a distribuição genotípica não apresentou diferença significativa na proporção encontrada. Também não foi encontrada relação entre a presença do alelo T neste polimorfismo e a condição de doença.

Recentemente Ying-he et al.<sup>110</sup>(2007) avaliaram os polimorfismos dos genes da família IL-1 em 59 pacientes com perda óssea antes do segundo estágio cirúrgico. O polimorfismo *IL1B+3954* não foi relacionado à perda óssea precoce enquanto que, para o polimorfismo *IL1B-511*, o genótipo T/T foi relacionado à maior perda óssea, de maneira que estes pacientes apresentaram cerca de tres vezes mais chance de perda óssea.

Shimpuku et al. <sup>96</sup>(2003) avaliaram o polimorfismo para IL-1 em 39 pacientes com perda óssea precoce e idiopática. Os autores observaram que o genótipo T/T para o polimorfismo *IL1B-511* apresenta correlação com essa perda óssea e que o polimorfismo *IL1B+3954* não está relacionado ao padrão de perda óssea avaliada. Estes autores demonstraram que os pacientes T/T para o polimorfismo *IL1B-511* têm uma chance cerca de dez vezes maior em apresentar perda óssea precoce. Os implantes com perda óssea precoce não apresentavam inflamação dos tecidos ao redor, pois os abutments ainda não estavam instalados e, portanto, os implantes não estavam expostos na cavidade oral. A avaliação do polimorfismo *IL1B-511* pode ser identificada como um possível fator de risco para a perda óssea não infecciosa, antes da instalação do abutment enquanto que a avaliação do polimorfismo *IL1B+3954* pode ser interessante após a colocação do abutment e exposição do implantes a cavidade oral <sup>96,110</sup>. Os resultados encontrados em nosso estudo para o polimorfismo *IL1B-511* estão de acordo com os relatos da literatura uma vez que, os implantes que avaliamos estavam expostos na cavidade oral a pelo menos um ano.

Outros estudos encontrados na literatura buscaram a influência do alelo T com a perda óssea, e este alelo foi correlacionado à destruição óssea e à condição de doença em implantes osseointegrados. Estudos com pacientes fumantes pesados, moderados, ex-fumantes e não

fumantes observaram um efeito somatório da presença do alelo T e o hábito de fumar<sup>23,34</sup>.

Para o polimorfismo *IL6-174*, embora o alelo mais frequente em ambos grupos de pacientes tenha sido o alelo G e o genótipo mais frequente tenha sido o homocigoto para o alelo G, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos. Também não foi encontrada nenhuma relação do alelo G com a condição de doença.

Em contraste aos nossos resultados, Trevilatto et al.<sup>105</sup>(2003) investigaram a relação do polimorfismo *IL6-174* em pacientes sem e com doença periodontal e, encontraram relação positiva entre este polimorfismo e a doença. Tervonen et al.<sup>102</sup>(2007) também associaram a presença do genótipo positivo (alelo G) com a severidade de doença periodontal. Alguns autores sugeriram um papel protetor para o alelo C, uma vez não encontraram pacientes homocigoto C/C com doença severa<sup>64,83</sup>. Em nossa amostra também não encontramos pacientes com o genótipo C/C no grupo com doença.

Além de investigar a presença do polimorfismo em pacientes com doença periodontal, Moreira et al.<sup>64</sup>(2007) avaliaram a concentração de IL-6 no soro dos pacientes. Os autores demonstraram maiores concentrações de IL-6 nos pacientes doentes e que apresentavam genótipo positivo para o polimorfismo do gene *IL6-174*. Semelhante a estes achados, Raunio et al.<sup>83</sup>(2007) associaram a maior concentração

de IL-6 no soro de pacientes com periodontite e que eram genótipo positivo.

O polimorfismo do gene IL6-174 pode ser relacionado com a severidade da doença periodontal <sup>102,105</sup>. Em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que busca relacionar o polimorfismo do gene *IL6-174* com a doença perimplantar e, não foram encontradas diferenças entre as distribuições alélicas e genóticas nos grupos com e sem perimplantite.

A ausência de uma relação positiva entre a perimplantite e a concentração das citocinas avaliadas, assim como com os polimorfismos estudados neste trabalho podem ser em decorrência do caráter crônico da doença avaliada.

A progressão e as conseqüências da doença são dependentes de uma interação sinérgica de várias citocinas pró e antiinflamatórias <sup>103</sup>, que podem ser influenciadas pelos polimorfismos presentes nos respectivos genes. A análise de polimorfismos genéticos pode ser considerada um teste de avaliação para a suscetibilidade positiva à doença. No entanto, deve-se ter em mente que esta avaliação não é um sinônimo de diagnóstico de doença, mas sim um indicador de futuro risco ao acometimento pela doença. Uma vez que a doença periodontal e perimplantar tem caráter multifatorial, a análise de polimorfismos genéticos deve ser realizada para complementar a avaliações clínicas, radiográficas, comportamentais e deve-se inclusive considerar as



condições sistêmicas que possam influenciar no perfil imunológico do paciente.

*Conclusão*

## 6 Conclusão

Diante dos limites deste estudo podemos concluir que os implantantes osseointegrados com perimplantite apresentam piores condições clínicas para SS, SUP, PS e NI. Dentre os microrganismos avaliados, os mais frequentes foram as bactérias *Pn* e *Tf*. Na amostra avaliada não há diferença no perfil microbiológico e imunológico dos grupos.

Podemos ainda, dizer que a característica genética dos pacientes estudados não tem relação com a condição do implante, pois na população estudada a distribuição dos polimorfismos *IL1B*+3954 e -511 e, *IL6*-174 é semelhante.

# *Referências*

## 7 Referências\*

1. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981; 6: 387-99.
2. Agerbaek MR, Lang MP, Persson GR. Comparisons of bacterial patterns present at implant tooth sites in subjects on supportive periodontal therapy. Part I – Impact of clinical variables, gender and smoking. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 18-24.
3. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
4. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993; 54: 1-78.
5. Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang, NP, Karring, T, eds. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Workshop on Periodontology.* London: Quintessence; 1993. p.365-9.
6. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986; 1: 11-25.
7. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implants sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontal Res.* 1989; 24: 96-105.

8. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-73.
9. Ataoglu H, Alptekin NO, Haliloglu S, Gursel M, Ataoglu T, Serpek B, et al. Interleukin- $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 470-6.
10. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990; 5: 31-8.
11. Bengazi F, Wennström JL, Lekholm U. Recession of the soft tissue margin at oral implants. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 303-10.
12. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3: 1-8.
13. Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2005; 76: 1490-5.

14. Campos Junior A, Passanesi E. Por que a osseointegração revolucionou a implantodontia? In: Todeschan FF, Botino MA. Atualização na clínica odontológica: a prática da clínica geral. São Paulo: APCD/ Artes Médicas; 1996. p. 249-97.
15. Campos MI, Santos MC, Trevillato PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure in non-smoking patients. Clin Oral Implants Res. 2005; 16: 194-201.
16. Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da osseointegração. In: Gomes LA. Implantes osseointegrados. Técnica e arte. São Paulo: Ed. Santos; 2002. p. 1-9.
17. Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodontology 2000. 1999; 20: 53-64.
18. Cheung VG, Spielman R.S. The genetic of variation in gene expression. Nat Genet. 2002; 32: 522-5.
19. D'aiuno F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. Cytokine. 2004; 28: 29-34.

20. De Boever AI, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 8-17.
21. Dinarello, C.A. The interleukin 1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 1994; 8: 1314-25.
22. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thompsen P. Biological factors contributing to failures osseointegrated oral implants. Part I. Study criteris and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 527-51.
23. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D. et al. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in well-maintained population. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14: 10-7.
24. Fenton MJ, Vermeulen MW, Clark BD, Webb AC, Auron PE. Human Pro-IL-1 $\beta$  gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. *J Immunol.* 1988; 140: 2267-73.
25. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudikin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels and na association with systemic-onset juvenile chronic pearthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1369-76.
26. Fransson C, Wennstrom J, Berglundh T. Clinical characteristics at implant with a history of progressive bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19: 142-7.



27. Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 501-8.
28. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin 6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-3.
29. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997; 14:112-43.
30. Gerber J, Wenaweser D, Heitz-Mayfield L, Lang NP, Person GR. Comparison of bacterial plaque samples from titanium implant and tooth surfaces by different surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17: 1-7.
31. di Giovine FS, Takhs E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 $\beta$  gene. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:450.
32. Gonzàles JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biasalski H, Meyle J. Concentration of interleukin - 1 $\beta$  and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 544-9.
33. Greentein G, Caton J, Polson AM. Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation. *J Periodontol.* 1981; 52: 420-5.

34. Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 gene genotype and smoking on prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 393-400.
35. Guash JF, Bertina RM, Reitsma PH. Five novel intragenic dimorphisms in the human interleukin 1 genes combine to high informativity. *Cytokine.* 1996; 8:598-602.
36. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1876-82.
37. Hanisch O, Cortella CA, Boskovic MM, James RS, Slots J, Wikesjö UM. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. *J Periodontol.* 1997; 68: 59-66.
38. Hultin M, Gustafsson A, Hallstrom H, Johansson LA, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 349-58.
39. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13: 357-68.
40. Johnson TC, Reinhardt RA, Payne JE, Dyer JK, Patil KD. Experimental gingivitis in periodontitis – susceptible subjects. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 618-25.

41. Kao RT, Curtis DA, Richards DW, Preble J. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10: 696-701.
42. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*. 1998; 3: 327-38.
43. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Periodontol*. 1997; 24:72-7.
44. Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Gomez-Roman G, Weebwe H, Haas S. Reliability of findings around healthy implants is association with oral hygiene measures: a clinical, microbiological, and immunological follow-up in edentulous patients. *Clin Oral Impl Res*. 2007; 18: 686-98.
45. Lang NP, Wetzel AC, Stich H, Caffese RG. Histologic probe penetration in healthy and inflamed peri-implant tissue. *Clin Oral Implants Res*. 1994; 5: 191-201.
46. Lee KH, Maiden MF, Tanner AC, Weber HC. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol*. 1999; 70: 131-8.

47. Leonhardt A, Dahlén G, Renvert S.. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol.* 2003; 74: 1415-22.
48. Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999; 10: 339-45.
49. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Lilgenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3: 9-16.
50. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 329-33.
51. Listgarten MA. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 15: 485-7.
52. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol.* 1999; 70: 431-7.
53. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177-87.

54. Luterbacher S, Mayfield L, Brägger U, Lang NP. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosa tissue conditions during supportive therapy (STP). *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11: 521-9.
55. MacCauley LK; Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol.* 2002; 73:1377-91.
56. Machtei EE, Oved-Peleg E, Peled M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implants platforms. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17:658-65.
57. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21:115-37.
58. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge KE, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71: 1699-707.
59. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 1999; 44: 535-9.

60. Mombelli A, Lang NP. Microbial aspects of implant dentistry. *Periodontol 2000*. 1994; 4: 74-80.
61. Mombelli A, Feloutzis A, Brägger U, Lang NP. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline: clinical, microbiological and radiological results. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 287-94.
62. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch EJr, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987; 2: 145-51.
63. Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1995; 22: 124-30.
64. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, et al. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148: 119-26.
65. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontol Res*. 1991; 26: 213-7.
66. Murata M, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, et al. Osteoclastin, deoxypyridinoline and interleukin 1 $\beta$  in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13: 646-63.

67. Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32:36-49.
68. Nemetz A, Tóth M, García-González MA, Zágoni T, Fehér J, Peña AS, et al. Allelic variation at the interleukin 1 $\beta$  gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001; 49: 644-9.
69. Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. Sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. *Genomics*. 2002; 79: 718-25.
70. Nishimura K, Itoh T, Takaki K, Hosokawa R, Naito T, Yokota M. Periodontal parameters of osseointegrated dental implants. A 4-year controlled follow-up study. *Clin Oral Implant Res*. 1997; 8: 272-8.
71. Nociti Jr FH, Cesco De Toledo R, Machado MA, Stefani CM, Line SR, Gonçalves RB. Clinical and microbiological evaluation of ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 295-300.
72. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel N1aIII Polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet*. 1998; 25: 267.
73. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res*. 1991; 26: 230-42.

74. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997; 14: 216-48.
75. Panagakos FS, Aboyoussef H, Dondero R, Jandinski JJ. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 1: 794-9.
76. Persson GR, Page RC. Effect of sampling time and repetition on gingival crevicular fluid and aspartate aminotransferase activity. *J Periodontol*. 1990; 25: 236-42.
77. Piattelli A, Scarano A, Dalla Nora A, De Bona G, Favero GA. Microscopical features in retrieved human Branemark implants: a report of 19 cases. *Biomaterials*. 1998, 19: 643-9.
78. Pola R, Flex A, Gaetani E, Lago AD, Gerardino L, Pola P, et al. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with Alzheimer's disease in an Italian population. *Neuroreport*. 2002; 13: 1645-7.
79. Pollanen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000*. 2003; 31:12-31.



80. Preshaw PM, Lauffart B, Brown P, Zak E, Heasman PA. Effects of keratolac tromethamine mouthrinse (0,1%) on the crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in untreated chronic periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69: 777-83.
81. Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Hong YS, Kim DW, et al. Polymorphisms of IL-1 $\beta$ , IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN- $\gamma$  genes in the Korean population. *Human Immunol.* 2003; 64: 979-89.
82. Qiriyinen M, Vogels R, Pauwels R, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial Subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res.* 2005; 84: 340-4.
83. Raunio T, Nixdorf M, Knuuttila M, Karttunen R, Vainio O, Tervonen T. The extent of periodontal disease and the IL-6 -174 genotype as determinants of serum IL-6 levels. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 1025-30.
84. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB, DuBois LM, Kornman KS, Choi JI, et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 225-31.
85. Renvert S, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Rutger Persson G. Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18: 509-16.

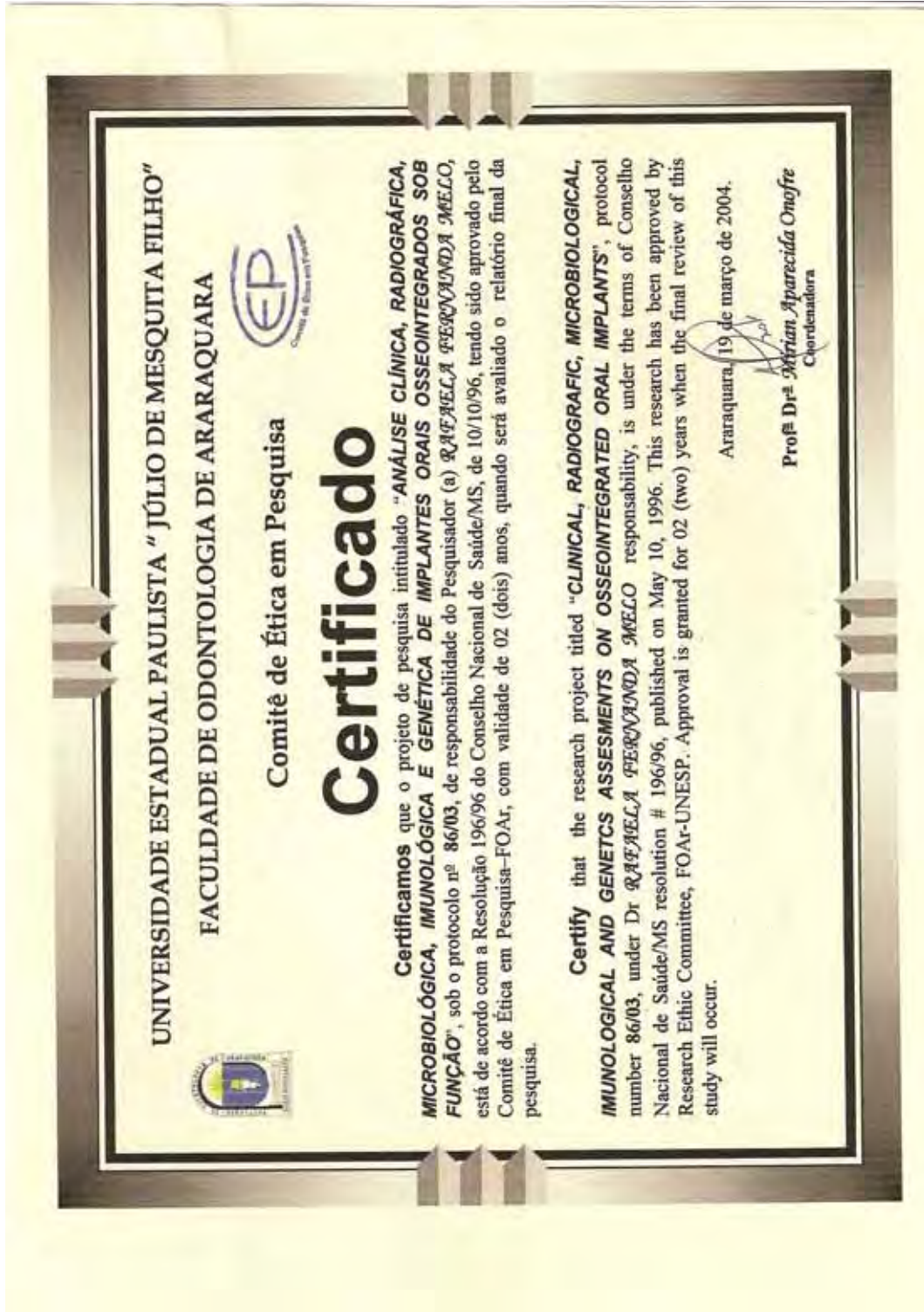
- 86.Revilla M, Obach V., Cervera A, Davalos A, Castilho J, Chamorro A. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett.* 2002; 324: 29-32.
- 87.Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ, et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontal Res.* 2002; 37: 37-41.
- 88.Roodman GD. Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 475-8.
- 89.Roos-Jansåker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine to fourteen-year follow up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J. Clin. Periodontol.* 2006; 33: 296-301.
- 90.Rutar A, Lang NP, Buser D, Bürgin W, Mombelli A. Retrospective assessments of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12: 189-95.
- 91.Salvi GE, Fürst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and another bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19: 242-8.

- 92.Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000; 58: 250-64.
- 93.Schou S, Holmstrup P, Hjorting-Hansen E, Lang NP. Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res.* 1992; 3: 149-61.
- 94.Schou S, Holmstrup P, Keiding N, Fiehn NE. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 190-200.
- 95.Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Fiel NE, Skovgaard LT. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingival. A histology comparison in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 113-26.
- 96.Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14: 423-9.
- 97.Sim E. Humoral factors. The natural immune system. New York: Oxford University Press; 1993.

98. Smith DE, Zarb GA. Criteria of success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989; 62: 567-72.
99. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probst L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 $\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 548-54.
100. Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002; 17: 696-702.
101. Taylor JJ, Preshaw PM, Donaldson PT. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 35: 158-82.
102. Tervonen T, Raunio T, Knuutila M, Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and the IL-6 genes associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 377-83.
103. Toijanac JA, Zarb CB, Gewerth ME, Banakis ML. A longitudinal clinical comparison of plaque induced inflammation between gingival and peri-implant soft tissues in the maxilla. *J Periodontol.* 2001; 72: 1139-45.
104. Trevisatto PC, Line S.R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2002; 18: 6-9.

105. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 438-42.
106. van Winkelhoff AJ, Goené RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11: 511-20.
107. Vozarova B, Fernandes-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD. The interleukin 6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in native American and Caucasians. *Hum Genet.* 2003; 112: 409-13.
108. Warlé M C, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl.* 2003; 9: 170-81.
109. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1942-6.
110. Ying-he L. et al. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 2340-4.

*Anexo*



3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Por este instrumento particular, declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, \_\_\_\_\_, (idade) \_\_\_\_\_,  
(Nacionalidade) \_\_\_\_\_, (Profissão) \_\_\_\_\_, portador do R.G. nº \_\_\_\_\_,  
Orgão Expedidor: \_\_\_\_\_, C.I.C. \_\_\_\_\_,  
residente e domiciliado à \_\_\_\_\_,  
\_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, Bairro: \_\_\_\_\_,  
Cidade: \_\_\_\_\_, Estado \_\_\_\_\_, Tel: \_\_\_\_\_, fui  
esclarecido sobre todos os procedimentos aos quais serei submetido no projeto de  
pesquisa intitulado "ANÁLISE CLÍNICA, RADIOGRÁFICA,  
MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E GENÉTICA DE IMPLANTES  
OSSEINTEGRADOS SOB FUNÇÃO". Se acaso alguma dúvida me restar, a  
pesquisadora responsável, Dra. Rafaela Fernanda Melo, por esta pesquisa deverá  
esclarecê-la. Vou me submeter a pesquisa proposta, nos termos abaixo  
relacionados:

1. Fui informado estar participando de um projeto de pesquisa que tem por objetivo coletar dados clínicos, radiográficos, microbiológicos, imunológicos e genéticos para correlacioná-los e concluir em quais condições encontram-se os implantes que estão com a prótese instalada e sob função a pelo menos um ano;
2. Fui esclarecido que estarei passando por um exame clínico periodontal completo, assim como serão realizadas radiografias dos implantes. Também será realizada coleta de material (fluido crevicular), na região dos implantes, para análise microbiológica e imunológica. Ainda, será feito um raspado da mucosa da bochecha para que o exame genético possa ser executado;
3. Fui informado que os exames clínicos serão realizados com o auxílio de sonda periodontal plástica, os exames radiográficos com filmes para radiografias intra-oral, as coletas para os exames microbiológico e imunológico com papel absorvente e o coleta para o exame genético com espátula de madeira;
4. Estou ciente de que todos os exames realizados pelo pesquisador serão feitos com material adequadamente esterelizado, minimizando o meu risco de contaminação;
5. Fui esclarecido que os exames realizados clínica, radiográfica e com o material coletado será para avaliar o meu risco em desenvolver doença na região dos implantes;

Protocolo CEP nº 76/03

Aprovado em Reunião de

19/03/04

\_\_\_\_\_  
Secretaria do CEP-FO/CAE



6. Estou ciente que o meu consentimento não exime a responsabilidade da pesquisadora responsável, a qual tem o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante a pesquisa;
7. Esclareço que minha adesão ao presente trabalho de pesquisa/tratamento foi voluntária, sem qualquer tipo de pressão ou coação por parte dos pesquisadores e pessoal de apoio;
8. Estou consciente de que deverei comparecer para exames inicial e após 6 meses para que os mesmos possam ser repetidos, sendo que se necessário deverei comparecer para que possa ser realizada uma raspagem periodontal / periimplantar;
9. Recebi explicações detalhadas da minha participação neste experimento, possuindo plena liberdade para me negar a participar da referida pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma, e tendo disponibilidade de tratamento odontológico e indenização a que tenho direito em casos de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
10. Autorizo, portanto, minha participação na pesquisa intitulada "Análise clínica, radiográfica, microbiológica, imunológica e genética de implantes orais osseointegrados sob função", concordando com a realização de fotografias, exames clínicos, radiográficos, microbiológicos, imunológicos e genético que permitam a observação das condições dos meus implantes, o qual poderá vir a ser utilizado com finalidades de material didático ( dar aulas ), e de divulgação em revistas científicas, brasileiras e estrangeiras;
11. Foi - me informado de que quando da divulgação e/ou publicação dos dados obtidos na presente investigação, estas serão informações CONFIDENCIAS, guardadas por forma de sigilo profissional, sendo minha identidade preservada;
12. Foi - me informado os telefones dos membros da equipe para atendimento em eventual intercorrência odontológica: ( 16 ) 2356924 / ( 16 ) 97038504;
13. Todas essas normas estão de acordo com *Código Nacional de Saúde* , segundo a resolução CSN 1996/96;
14. Consta o telefone da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para recuso ou reclamações: ( 16 ) 2016432 ou ( 16 ) 2016434.

Rafaela F. Melo  
Pesquisadora Responsável  
Rafaela Fernanda Melo

Protocolo CEP nº 26/03

Aprovado em Reunião de

19/03/04

Kc

Secretaria do CEP-FO/CAr.

### Anexo 3

**Paciente nº:** \_\_\_\_\_

#### ANAMNESE

Dados Pessoais:

**Nome:**

\_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_

Saúde Geral:

***Está em tratamento médico? ( )S ( )N***  
***Porque?*** \_\_\_\_\_

Faz exames complementares de rotina?

( )S ( )N

Quais? \_\_\_\_\_

Já esteve hospitalizado? ( )S ( )N

Porque? \_\_\_\_\_

Quando? \_\_\_\_\_

Sua cicatrização é normal? ( )S ( )N

Apresenta ou apresentou alguma doença nos últimos 6 meses?

( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_  
Quando? \_\_\_\_\_

Está tomando ou tomou algum medicamento nos últimos 6 meses?  
( )S ( )N Quais?

\_\_\_\_\_

Ingere bebidas alcóolicas? ( )S ( )N Frequência: \_\_\_\_\_

Fumante? ( )S ( )N Há quanto tempo? \_\_\_\_ Frequência: \_\_\_\_\_

Ex-fumante? ( )S ( )N Por quanto tempo? \_\_ Frequência: \_\_\_\_\_

Saúde Bucal:

***Há quanto tempo realizou a cirurgia da instalação do implante? \_\_\_\_\_***

***Há quanto tempo a prótese foi instalada?***

\_\_\_\_\_

***Já fez tratamento gengival? ( )S ( )N Quando?***

\_\_\_\_\_

***Já fez tratamento periimplantar? ( )S ( )N Quando? \_\_\_\_\_***

Está sob terapia de manutenção dos implantes? ( )S ( )N  
Quando foi a última consulta de manutenção? \_\_\_\_\_

Sua gengiva dói? ( )S ( )N  
Quando? \_\_\_\_\_ Região: \_\_\_\_\_

Sua gengiva sangra com facilidade? ( )S ( )N Região: \_\_\_\_\_

Sente seus dentes inseguros? ( )S ( )N

Sente algum implante solto? ( )S ( )N Qual (is)? \_\_\_\_\_

Quantas vezes escova os dentes por dia? \_\_\_\_\_

Qual o tipo de escova? \_\_\_\_\_

Usa escova bitufo? ( )S ( )N Apenas nos implantes? ( )S ( )N

Usa fio dental? ( )S ( )N Freqüência: \_\_\_\_\_

Usa palito? ( )S ( )N Freqüência: \_\_\_\_\_

Usa algum tipo de solução para bochecho? ( )S ( )N

Qual? \_\_\_\_\_ Freqüência: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

---

Data: \_\_\_/\_\_\_/200\_\_.

**Implante:** \_\_\_\_\_

	MV	V	DV	ML	L	DL
IP						
IG						
PS						
NG						
SS						
SUP						

**Dente:** \_\_\_\_\_

	MV	V	DV	ML	L	DL
IP						
IG						
PS						
NG						
SS						