UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANDRÉIA PEREIRA DE SOUZA

Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários

BAURU
2016

ANDRÉIA PEREIRA DE SOUZA

Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greghi

Versão corrigida

BAURU
2016

So89a

Souza, Andréia Pereira de
Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários / Andréia Pereira de Souza. – Bauru, 2016.
136 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greghi

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 1.113.725
Data: 17/06/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Andréia Pereira de Souza

NASCIMENTO	04 de julho de 1989
NATURALIDADE	Jundiaí – SP
FILIAÇÃO	Antonio Pereira de Souza e Conceição Imaculada Capobianco Pereira de Souza
2007 – 2010	Curso de graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)
2008 – 2010	Bolsista do Programa de Educação Tutorial do Ministério da Educação (PET-MEC/SESu)
2010 – 2011	Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia pela APCD de Bauru
2013 – 2014	Especialização em Periodontia pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP)
2015 – 2016	Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia Straumann pela FUNBEO
2014 – 2017	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia, pela FOB-USP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu Mestre e Senhor, pois sem Ele nada disso seria possível. É Ele que tem me ajudado a cada instante da minha vida, mesmo sem eu merecer. Sou eternamente grata por sempre cuidar de mim demonstrando o quão grande é seu amor para comigo.

"Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares." (Josué 1.9 – Bíblia Sagrada)

Aos meus pais, Antonio e Conceição,

Dedico especialmente aos meus pais, pois sempre me apoiaram incondicionalmente, me ensinaram e me incentivaram a sempre trilhar o melhor caminho. Desfruto hoje de mais uma conquista nesta caminhada, da qual vocês abriram mão, porém fizeram questão que eu a tivesse. Pelo amor que sempre demonstraram por mim, agradeço imensamente.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao **Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greghi**, pela oportunidade de ser sua aluna de Mestrado, por cada ensinamento e contribuição para minha formação profissional. Além de um grande exemplo e inspiração de professor para mim, tem sido também um exemplo de conduta profissional e pessoal. Muito obrigada professor!

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pela fundamental contribuição para realização deste trabalho, sempre pronto a me atender e ajudar. Não esquecerei suas palavras quando retornei ao ambiente universitário, há alguns anos: “O bom filho à casa torna!”. Sinto-me muito feliz por ser sua aluna! O senhor é um dos grandes exemplos de vida para mim.

A minha mãe, **Conceição**, mulher batalhadora, mãe dedicada, minha amiga e meu socorro sempre que precisei. Obrigada pelo amor, pelo carinho, pela paciência, compreensão e pelo apoio em tudo, sempre. A senhora sabe o quanto a amo!!!

Ao meu pai, **Antonio**, obrigada pela educação que me deu desde criança, pelo apoio, preocupação e cuidado comigo. Pai, sem vocês eu não teria chegado até onde cheguei hoje. Muito obrigada por tudo!

A minha irmã, **Gabriela**, pelo amor de irmã, pelo cuidado de amiga, por me ensinar algumas coisas que jamais pensei que aprenderia de você! Eu te amo!

Ao anjo que Deus colocou em minha vida nesse último ano, para cuidar de mim, me apoiar, me incentivar e ser mais que um namorado, mas também meu melhor amigo. Obrigada **Danilo**! Você é o melhor presente de Deus pra mim!

A minha segunda mãe, **Helenice**, pelo exemplo que tem sido, por me receber tão bem e dividir muitas alegrias comigo. Obrigada por todo carinho. Deus sabe quais as pessoas certas para colocar em nossas vidas!

Aos funcionários **Thiago** (Laboratório de Farmacologia, FOB-USP) e **Giuliana** (Laboratório de Medicina, FMRP-USP), pela contribuição fundamental durante as fases laboratoriais deste estudo. Por tudo que me ensinaram, pela paciência e dedicação que demonstraram. Sua participação foi imprescindível para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

Aos meus amigos que ingressaram no mestrado comigo, **Raphaella**, **Luísa**, **Gustavo** e **Vitor**, pelos momentos sérios e pelos momentos divertidos! Pela amizade sincera que construímos, a qual espero que dure por muitos e muitos anos, independente da distância que possa nos separar. Vocês se tornaram uma verdadeira família pra mim! Muito obrigada por serem tão especiais!

Aos demais colegas pós-graduandos da periodontia **Érika**, **Giovana**, **Ísis**, **Matheus**, **Lucas**, **Rafael**, **Paula Cunha**, **Maria Alejandra**, **Jefrey**, **Mônica**, **Bruna**, **Alejandra Frias**, **Paula Karan**, agradeço pela convivência, pela amizade e por terem feito parte desse capítulo da minha formação, muito obrigada.

As demais professoras do departamento de Periodontia, **Profª. Drª. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana**, **Profª. Drª. Mariana Schützer Ragghianti Zangrando**, **Profª. Drª. Maria Lúcia Rubo de Rezende** e **Profª. Drª. Carla Andreotti Damante**, por cada ensinamento, por cada puxão de orelha, por cada palavra de incentivo e apoio. A participação de cada uma de vocês tem sido essencial em minha formação. Muito obrigada!

Aos funcionários da Periodontia **Marcão**, **Ivânia**, **Edilaine** e **Marcela**, pela paciência e apoio fundamentais para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos demais **funcionários** da FOB-USP que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **pacientes** que confiaram em mim e que aceitaram me ajudar, tornando possível a realização desta pesquisa.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, da Universidade de São Paulo, através de sua diretora **Profª. Drª. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, por nos oferecer uma excelente infraestrutura para nossa formação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa, através do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos (Processo 2015/03965-2).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela disponibilidade da bolsa de estudo.

"Afinal, antes de entrar numa batalha, é preciso planejar bem, e, quando há muitos conselheiros, é mais fácil vencer."

(Provérbios 24.6 – Bíblia Sagrada)

“Mau será o dia do homem quando ele se tornar absolutamente satisfeito com a vida que está levando, quando não estiver mais eternamente batendo nas portas de sua alma um enorme desejo de fazer algo maior.”

Phillips Brooks

RESUMO

Uma faixa adequada de mucosa ceratinizada (MC) é importante para garantir condições mínimas necessárias para o estabelecimento da homeostasia do periodonto de proteção. Frente à infecção bacteriana, os tecidos periodontais e peri-implantares desenvolvem uma resposta imune inflamatória local, resultando na produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios que podem ser encontrados no fluido do sulco gengival e peri-implantar. Entretanto, é escassa a literatura acerca dos níveis desses mediadores em sítios peri-implantares considerando a faixa de MC. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre a quantidade e qualidade da MC peri-implantar e parâmetros clínicos e a qualidade da resposta imune através da análise da concentração de mediadores inflamatórios (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF) presentes no fluido peri-implantar humano antes (T_1) e depois (T_2) da raspagem subgengival, através de imunoensaio. Parâmetros clínicos avaliaram índice de placa (IP), supuração a sondagem (S), profundidade de sondagem (mesial-PSM, centro-PSC e distal-PSD), índice de sangramento (mesial-ISM, centro-ISC e distal-ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da MC na face vestibular. Amostras de fluido sulcular foram coletadas e analisadas. Os implantes foram divididos em grupos de acordo com a faixa de MC (G1≤2mm e G2>2mm) e espessura de MC (GA_1≤1mm e GB_1>1mm; GA_2≤1,5mm e GB_2>1,5mm). Foram avaliados 20 pacientes (11 homens e 9 mulheres) com idade entre 40 e 80 anos (53,45±10,32), que apresentaram 42 implantes (G1=25 e G2=17). Os resultados clínicos demonstraram diferença estatística significativa apenas entre T_1 e T_2 dentro do G1 para IP (T_1=56% e T_2=16%) e ISM (T_1=68% e T_2=40%). Foi observada diferença estatística entre G1 e G2 apenas para IL-1β em T_2 (G1=9,77pg/ml±12,44 e G2=30,13pg/ml±32,29). Intra-grupos, todas as citocinas aumentaram significativamente, mas apenas no G2, demonstrando diferença de reatividade entre grupos. Quanto à espessura da MC (GA_1=6 e GB_1=36), resultados clínicos revelaram diferença inter-grupos para ISC em T_2 (GA_1=16,67% e GB_1=61,11%) e intra-grupos para IP no GB_1 (T_1=52,78% e T_2=27,78%). Houve aumento significativo no GB_1 para todas as citocinas, exceto VEGF, assim como para IL-1β no GA_1. Quando a amostra foi redistribuída em GA_2=24 e GB_2=18, os resultados clínicos indicaram diferença estatística inter-grupos para PSC em T_2 (GA_2=2,58mm±1,06 e

GB_2=3,11mm±1,02) e intra-grupos para IP (T_1=62,5% e T_2=20,83%) e PSC (T_1=2,92mm±1,18 e T_2=2,58mm±1,06) no GA_2 e para ISM (T_1=55,56% e T_2=27,78%) no GB_2. Intra-grupos observou-se aumento significativo para todas as citocinas no GA_2 exceto VEGF, assim como IL-8 no GB_2. Conclui-se que as diferenças clínicas apresentadas tenderam a evidenciar a importância da MC principalmente após o preparo inicial e, além disso, uma faixa de MC maior que 2mm influenciou os níveis dos mediadores inflamatórios avaliados após a raspagem subgengival. Adicionalmente, a falta de diferença estatística significativa na comparação entre grupos com diferentes espessuras de MC, bem como tal diferença ora no grupo espesso ora no grupo fino quando se adotam diferentes valores de corte (1mm ou 1,5mm respectivamente), demonstra resultados inconclusivos, ressaltando a importância de novas pesquisas para responder esta questão.

Palavras-chave: Citocinas. Implantes Dentários. Gengiva.

ABSTRACT

Clinical and biological markers analysis in peri-implant fluid and correlation with the keratinized mucosa around dental implants

An adequate keratinized mucosa (KM) width is important to ensure minimal conditions necessary to establish protect periodontium homeostasis. When a bacterial infection occurs, periodontal and peri-implant tissues develop a local inflammatory immune response that results in production and release of several inflammatory mediators that may be found in gingival crevicular and in peri-implant fluids. However, there is a lack of literature concerning about the levels of these mediators in peri-implant sites considering KM width. The aim of this study was to evaluate the association between KM peri-implant quantity and quality and clinical parameters and immune response quality by analyzing the inflammatory mediators concentration (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α and VEGF) present in human peri-implant fluid before (T_1) and after (T_2) subgingival scaling, by immunoassay. Clinical parameters evaluated plate index (PI), probing suppuration (S), probing depth (mesial-PDM, center-PDC and distal-PDD), bleeding index (mesial-BIM, center-BIC and distal-BID), relative attachment level (RAL), keratinized mucosa width (KMW) and thickness (KMT) on the buccal face. Sulcular fluid samples were collected and analyzed. The implants were divided in groups according KM width (G1≤2mm and G2>2mm) and KM thickness (GA_1≤1mm and GB_1>1mm, GA_2≤1,5mm and GB_2>1,5mm). Twenty patients (11 men and 9 women) aged 40 to 80 years (53,45±10,32) were evaluated, with 42 implants (G1=25 and G2=17). Clinical results showed a significant statistical difference only between T_1 and T_2 within G1 for PI (T_1=56% and T_2=16%) and BIM (T_1=68% and T_2=40%). Statistical difference was observed between G1 and G2 only for IL-1β in T_2 (G1=9,77pg/ml±12,44 and G2=30,13pg/ml±32,29). Intra-groups, all cytokines increased significantly, but only in G2, showing reactivity difference between groups. As to KM thickness (GA_1=6 and GB_1=36), clinical results revealed intergroup differences for BIC in T_2 (GA_1=16,67% and GB_1=61,11%) and intra-groups for PI in GB_1 (T_1=52,78% and T_2=27,78%). There was a significant increase in GB_1 for all cytokines except VEGF, as well as for IL-1β in GA_1. When the sample was redistributed in GA_2=24 and GB_2=18, clinical results indicated statistical inter-group differences for PDC in T_2 (GA_2=2,58mm±1,06 and

GB_2=3,11mm±1,02) and intra-groups for PI (T_1=62,5% and T_2=20,83%) and PDC (T_1=2,92mm±1,18 and T_2=2,58mm±1,06) in GA_2 and for BIM (T_1=55,56% and T_2=27,78%) in GB_2. Intra-groups were observed significantly increase for all cytokines in GA_2 except VEGF, as well as IL-8 in GB_2. Concluded that clinical differences presented tended to show the KM importance principally after the initial preparation and, in addition, KM width greater than 2mm influenced the inflammatory mediators levels evaluated after subgingival scaling. Additionally, the absence of significant statistic difference between groups when comparing the keratinized mucosa thickness, as well as this difference sometimes in the thick group or in the thin group when different court values was adopted (1mm or 1,5mm respectively), show inconclusive results, emphasizing the importance of new research that may answer this question.

Key words: Cytokines. Dental Implants. Gingiva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de fluxo de estudo 59

Figura 2 - Placa para dosagem de proteínas totais..... 64

Figura 3 - Placa para quantificação das citocinas - Luminex..... 65

Figura 4 - Esquema das diluições em série para o preparo da curva padrão.. 68

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Índice de placa (% de sítios) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos 1 e 2..... 77

Gráfico 2 - Índice de placa (% de sítios) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos A_1 e B_1..... 81

Gráfico 3 - Índice de placa (% de sítios) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos A_2 e B_2..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo do controle de qualidade para as citocinas analisadas... 66

Tabela 2 - Preparo da solução padrão 10x..... 68

Tabela 3 - Diluições em série para o preparo da curva padrão..... 68

Tabela 4 - Distribuição da amostra por idade (média ± desvio padrão), gênero e número de implantes avaliados..... 73

Tabela 5 - Estatística descritiva para variáveis medidas em escore de toda a amostra (n = 42), de ambos os grupos (G1 e G2)..... 74

Tabela 6 - Estatística descritiva para variáveis quantitativas de toda a amostra (n = 42), de ambos os grupos (G1 e G2)..... 75

Tabela 7 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos G1 e G2, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada..... 76

Tabela 8 - Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos G1 e G2, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)..... 78

Tabela 9 - Valores de média, desvio-padrão e “p” encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo 2, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)..... 79

Tabela 10 - Distribuição da amostra para os grupos A_1 e B_1, de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada ≤ 1mm e > 1mm respectivamente..... 79

Tabela 11 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_1 e GB_1, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada..... 80

Tabela 12 - Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_1 e GB_1, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)..... 82

Tabela 13 - Valores de média, desvio-padrão e "p" encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo B_1, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α)..... 83

Tabela 14 - Distribuição da amostra para os grupos A_2 e B_2, de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada ≤ 1,5mm e > 1,5mm respectivamente..... 84

Tabela 15 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos A_2 e B_2, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada..... 85

Tabela 16 - Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_2 e GB_2, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)..... 87

Tabela 17 - Valores de média, desvio-padrão e "p" encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo A_2, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α)..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Desvio padrão
°C	Graus Celsius
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
µl	Microlitros
%	Porcentagem
™	Trademark
APCD	Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
cm	Centímetros
DP	Desvio padrão
Dr(a).	Doutor(a)
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
EMC	Espessura da Mucosa Ceratinizada
et al.	E outros; e colaboradores
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FUNBEO	Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
GA_1	Grupo A_1
GA_2	Grupo A_2
GB_1	Grupo B_1
GB_2	Grupo B_2
h	Horas

HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
il.	Ilustrada
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-USA	Illinois United State of America
Inc.	Incorporated
IP	Índice de Placa modificado
ISC	Índice de Sangramento no Centro
ISD	Índice de Sangramento Distal
ISM	Índice de Sangramento Mesial
ITI	International Team for Implantology
JCE	Junção Cemento Esmalte
LMC	Largura da Mucosa Ceratinizada
LMCC	Largura da mucosa ceratinizada no centro da face vestibular
LMCDV	Largura da mucosa ceratinizada disto-vestibular
LMCMV	Largura da mucosa ceratinizada mésio-vestibular
LPS	Lipopolissacarídeos
Ltda.	Limitada
MC	Mucosa Ceratinizada
MEC/SESu	Ministério da Educação/Secretaria de Educação Superior
MIP-1α	Proteína Inflamatória para Macrófago alfa
mg/g	Miligrama por grama
ml	Mililitros
mm	Milímetros

MMPs	Metaloproteinases
nº	Número
NI	Nível de Inserção
NIR	Nível de Inserção Relativo
nm	Nanômetros
OK	Oklahoma
p.	Páginas
PCPUNC	Periodontal Probe of University of North Carolina
PET	Programa de Educação Tutorial
pg/ml	Picograma por mililitro
PGE_2	Prostaglandina E_2
PMN	Polimorfonucleares
Prof(a).	Professor(a)
PS	Profundidade de Sondagem
PSC	Profundidade de Sondagem no Centro
PSD	Profundidade de Sondagem na Distal
PSM	Profundidade de Sondagem Mesial
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
S	Supuração
SP	São Paulo
SS	Sangramento à sondagem
T_1	Primeiro período de avaliação
T_2	Segundo período de avaliação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral beta
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
WA	Washington

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 23

2 **REVISÃO DE LITERATURA**..... 27

2.1 A MUCOSA CERATINIZADA E SUA IMPORTÂNCIA NA HOMEOSTASIA TECIDUAL..... 29

2.2 O FLUIDO DO SULCO GENGIVAL/PERI-IMPLANTAR E A DETECÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS..... 41

2.3 PARÂMETROS PARA MONITORAMENTO PERI-IMPLANTAR..... 47

3 **PROPOSIÇÃO**..... 49

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO..... 51

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS..... 51

4 **MATERIAL E MÉTODOS**..... 53

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA..... 55

4.2 PADRONIZAÇÃO DA AMOSTRA..... 57

4.3 COLETA DO FLUIDO DO SULCO PERI-IMPLANTAR..... 57

4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICOS PERI-IMPLANTARES..... 58

4.4.1 **Índice de Placa modificado por Mombelli et al. (1987) (IP)**..... 60

4.4.2 **Supuração**..... 60

4.4.3 **Profundidade de Sondagem (PS)**..... 61

4.4.4 **Nível de Inserção Relativo (NIR)**..... 61

4.4.5 **Índice de Sangramento à Sondagem (IS)**..... 62

4.4.6 **Largura (LMC) e Espessura (EMC) da Mucosa Ceratinizada**..... 62

4.5 DOSAGEM PROTEICA DAS AMOSTRAS DE FLUIDO DO SULCO PERI-IMPLANTAR: MÉTODO DE BRADFORD..... 63

4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α E VEGF PRESENTES NO FLUIDO DO SULCO PERI-IMPLANTAR..... 64

4.6.1 **Preparação dos Reagentes para Imunoensaio.....** 65
A Preparação das Beads imobilizadas por anticorpos..... 65
B Preparação dos Controles de Qualidade..... 66
C Preparação de tampão de lavagem (Wash Buffer)..... 67
D Preparação da Curva Padrão de Citocina Humana..... 67
4.6.2 **Procedimentos para o Imunoensaio.....** 68

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 70

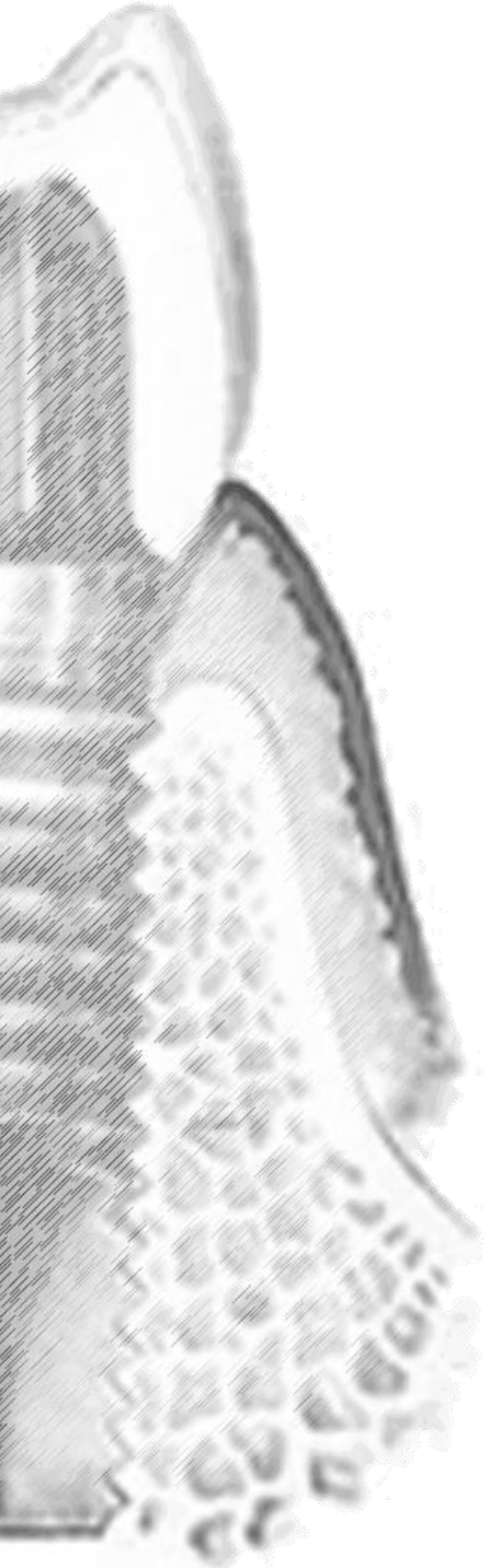
5 **RESULTADOS.....** 71

6 **DISCUSSÃO.....** 89

7 **CONCLUSÕES.....** 109

REFERÊNCIAS..... 113

ANEXOS..... 129



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Após o advento da osseointegração, os implantes dentários têm sido uma alternativa promissora para reabilitação oral (BRANEMARK et al., 1969). As altas taxas de sucesso demonstradas desde o início de sua utilização (ALBREKTSSON et al., 1986), têm encorajado os profissionais a substituir um ou mais dentes ausentes por implantes osseointegrados (MORASCHINI et al., 2015; AL-SAWAI; LABIB, 2016; SOUSA et al., 2016).

A fim de garantir condições mínimas necessárias para o estabelecimento da homeostasia do periodonto de proteção ao redor dos implantes dentários, uma faixa adequada de mucosa ceratinizada é importante, assim como ocorre para os tecidos periodontais. Diversos estudos têm demonstrado que a presença de mucosa ceratinizada adequada, tanto em altura como em espessura, é necessária para manter a estabilidade da margem gengival, auxiliando no selamento marginal. Por outro lado, essa faixa tecidual prioriza a saída do fluido gengival via sulco, diminuindo a penetração de bactérias e formação de placa bacteriana quando se observa uma higiene bucal insatisfatória. (LANG; LÖE, 1972; STELER; BISSADA, 1987; LAGOS, 2003; RESENDE, 2004; LAGOS et al., 2011).

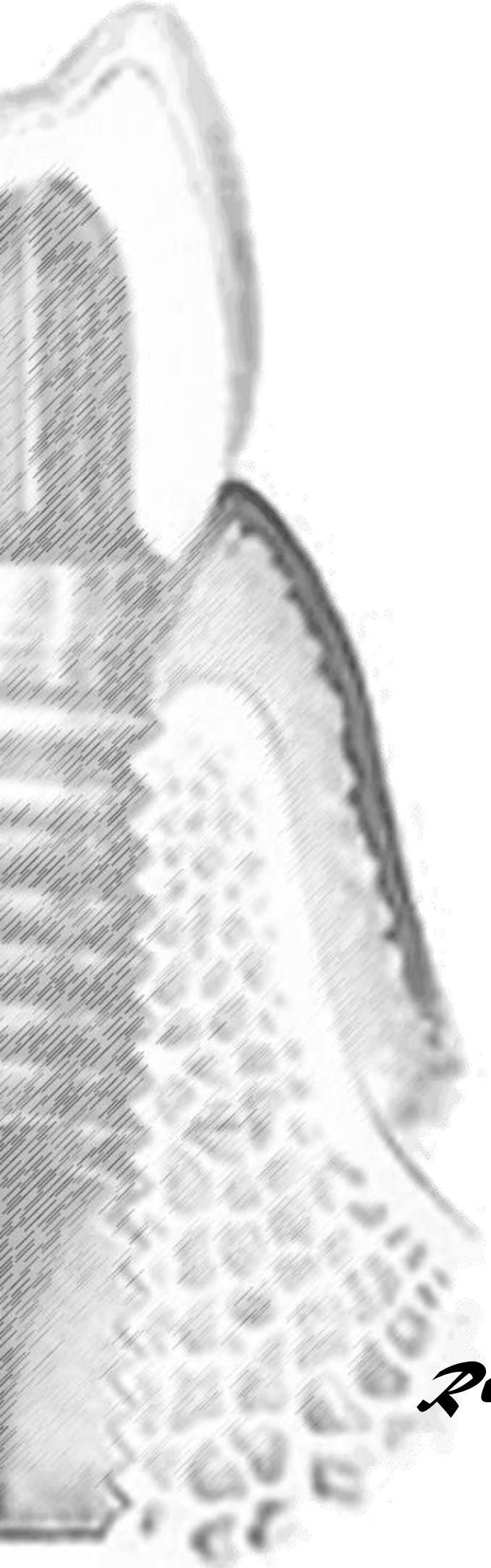
De acordo com alguns autores, quando a faixa de mucosa ceratinizada ao redor dos implantes dentários é pequena, ou seja, menor que 2 mm em altura, é observado maior índice de placa bacteriana, maior perda de osso alveolar, maior incidência de sangramento à sondagem e sinais de inflamação (ALBREKTSSON et al., 1986; NEMCOVSKY; MOSES; ARTZI, 2000; BOURI et al., 2008). Já em situações onde se observa uma faixa maior de mucosa ceratinizada peri-implantar com 2 mm ou mais em altura, as condições de saúde dos tecidos apresentam-se melhoradas, os procedimentos de moldagem são facilitados, existe maior resistência às forças mastigatórias e durante os procedimentos de higiene bucal, menor sinal de inflamação gengival, margem gengival resistente a recessões, melhor estética com auxílio na formação de papilas, e principalmente, uma maior resistência à progressão do processo inflamatório (ALBREKTSSON et al., 1986).

Frente a uma infecção bacteriana, os tecidos periodontais e peri-implantares desenvolvem uma resposta imune inflamatória local, resultando na produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios por diferentes tipos

celulares envolvidos na resposta defensiva do hospedeiro contra patógenos periodontais. Tais mediadores podem ser encontrados no fluido do sulco gengival e também peri-implantar, um transudado de fluido intersticial do tecido gengival que na presença de inflamação se transforma em exsudato inflamatório, contendo em sua composição tanto substâncias do hospedeiro como também de micro-organismos da placa supra e subgengival (LAMSTER et al., 2007). Embora ainda não seja utilizado como ferramenta de diagnóstico na prática clínica, o fluido sulcular tem sido utilizado na investigação de doenças que afetam a cavidade bucal, sendo que os marcadores biológicos presentes nesse fluido são pesquisados pois podem estar presentes nas doenças periodontais (MURATA et al., 2002; LOOS; TJOA, 2005; GUPTA, 2012; ALROWIS et al., 2014).

Devido às semelhanças entre os tecidos periodontais e peri-implantares, vários pesquisadores tem investigado na mucosa peri-implantar os mesmos marcadores e citocinas utilizados nos estudos periodontais (YAGHOBEE; KHORSAND; PAKNEJAD, 2013; YAGHOBEE et al., 2014 RECKER et al., 2015). Citocinas são polipeptídeos, um grupo diverso de proteínas e peptídeos solúveis, que atuam como reguladores tanto em condições normais como patológicas, a fim de modular as atividades funcionais de células e tecidos. Estas proteínas também mediam interações diretamente entre as células e regulam processos que ocorrem no ambiente extracelular, estando envolvidas na mediação e regulação das respostas imune e inflamatória. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Estudos envolvendo citocinas/quimiocinas possuem um papel importante no entendimento de estados patológicos como doença inflamatória, reações alérgicas, doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas, sepse e até câncer.

Em virtude de ser escassa a literatura científica acerca dos níveis de mediadores inflamatórios detectados em sítios peri-implantares levando-se em consideração a faixa de mucosa ceratinizada, propõe-se o presente trabalho avaliar clinicamente os tecidos peri-implantares e analisar comparativamente os níveis de mediadores inflamatórios (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF) presentes no fluido do sulco peri-implantar humano de acordo com a faixa de mucosa ceratinizada presente.



Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Mucosa Ceratinizada e sua Importância na Homeostasia Tecidual

De acordo com Schroeder e colaboradores (1997), a gengiva é a parte da mucosa mastigatória que recobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Ela é dividida em gengiva marginal livre e gengiva inserida. A primeira estende-se da margem gengival em direção apical até o nível correspondente à junção cemento esmalte (JCE), onde encontra a ranhura gengival livre que a separa da gengiva inserida. Esta, por sua vez, com textura firme e inserida, segue também em direção apical até a junção mucogengival, onde se torna contínua com a mucosa alveolar.

A mucosa ceratinizada (MC), portanto, corresponde à faixa de tecido mole recoberto por epitélio ceratinizado, que se estende da margem gengival até a junção mucogengival e é composta por tecido conjuntivo denso e rico em fibras colágenas (CONSENSUS REPORT, 1996). Ela pode variar em dentes permanentes de 1 a 9 mm de largura, tendendo a aumentar com a erupção constante dos dentes, apresentando variação intra e inter-individual (BOWERS, 1963; AINAMO; LÖE, 1966; LANG; LÖE, 1972; ROSE; APP, 1973; EGER; MÜLLER; HEINECKE, 1996; GENCO, 1997).

As diferenças individuais observadas tanto na largura quanto na espessura gengival geralmente são determinadas geneticamente (GOASLIND et al., 1977; OLSSON; LINDHE, 1991; EGER; MÜLLER; HEINECKE, 1996; SEIBERT; LINDHE, 1989) e sua variação inter e intra-individual é amplamente investigada. Entretanto, tais valores podem ser ainda afetados pela presença de inflamação associada a placa bacteriana ou pela ação de certas intervenções mecânicas (MARQUEZ, 2004).

Desde que não ocorra recessão gengival, sua largura aumenta com a idade (BOWERS, 1963; AINAMO; TALARI, 1976; AINAMO; AINAMO; POIKKEUS, 1981) da dentição decídua para a permanente (BOWERS, 1963; ROSE; APP, 1973), sendo maior na maxila do que na mandíbula (MÜLLER; EGER, 2002). É dependente ainda da altura do processo alveolar e da dimensão vertical da face (MAZELAND, 1980).

No trabalho de Lang e Löe (1972), os autores procuraram estabelecer uma relação entre a largura da mucosa ceratinizada e a condição de saúde gengival. Eles avaliaram a condição gengival de 1406 faces vestibulares e linguais em 32 indivíduos após seis semanas de higienização supervisionada, utilizando como parâmetros de avaliação o índice gengival e o índice de placa. Seus resultados mostraram variação no índice de exsudato gengival, sendo que mesmo em indivíduos com uma higiene oral eficiente, áreas com menos de 2 mm de mucosa ceratinizada exibiam inflamação persistente, sendo observado nessas regiões um comportamento tecidual mais compatível com alterações patológicas do que fisiológicas. Essas observações foram sugestivas de que a faixa de mucosa ceratinizada influencia o comportamento fisiológico do sulco gengival. Os autores concluíram que o mínimo de 2 mm de mucosa ceratinizada, sendo 1 mm de gengiva inserida, seria uma quantidade adequada para se manter a saúde gengival.

Maynard e Wilson (1979) afirmaram que se houver uma margem de restauração subgengival, são necessários 5 mm de mucosa ceratinizada, em que pelo menos 3 mm sejam gengiva inserida para se manter a homeostasia dos tecidos. Ocasionalmente as restaurações subgengivais podem apresentar sucesso clínico mesmo com uma faixa menor de mucosa ceratinizada, entretanto para que se tenha previsibilidade no resultado do tratamento os autores sugerem que sejam seguidas as dimensões propostas, além de avaliar e adequar, quando indicado, a espessura do tecido ceratinizado.

Stetler e Bissada (1987) também objetivaram avaliar a condição periodontal de dentes com restaurações subgengivais. Foram avaliados 58 dentes em 26 indivíduos que revelaram índice gengival significativamente maior para dentes com restaurações subgengivais associados a uma faixa estreita de mucosa ceratinizada, quando comparados a dentes com restaurações subgengivais e uma faixa mais larga de mucosa ceratinizada. Os autores sugeriram aumento da faixa de tecido ceratinizado para indivíduos com restaurações subgengivais com faixa estreita de mucosa ceratinizada e que não fossem capazes de manter um nível ótimo de controle de placa bacteriana.

Já Dorfman e colaboradores (1980) observaram em seu estudo que mesmo uma faixa de gengiva inserida menor do que 1 mm é adequada se houver controle da inflamação. Para isso, neste estudo a terapia de manutenção dos

pacientes para controle de placa bacteriana e redução da inflamação foi rigorosamente seguida e consistiu em raspagem e alisamento radicular e reforços de higiene oral periodicamente com intervalos de 3 meses ou menos (com o mínimo de 3 semanas entre as sessões de atendimento).

Outros autores também demonstraram que a faixa de mucosa ceratinizada não é relevante quando existe um controle estrito da higiene oral, tanto profissional como pelo próprio paciente (DORFMAN et al., 1980; LINDHE; NYMAN, 1980; TREY; BERNIMOULIN, 1980; WENNSTRÖM; LINDHE, 1983; KISCH; BADERSTEN; EGELBERG, 1986; WENNSTRÖM, 1987). Entretanto, mesmo que o controle de placa bacteriana pelo paciente seja adequado, tais áreas estariam mais sujeitas à perda de inserção clínica (BOWERS, 1963).

Neste sentido, é possível encontrar na literatura inúmeros trabalhos enfatizando a importância da mucosa ceratinizada na homeostasia do periodonto. Quando são avaliados índices clínicos periodontais como nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e amplitude do sulco gengival é possível relacioná-los à quantidade presente de mucosa ceratinizada. (LANG; LÖE, 1972; AINAMO; AINAMO, 1978; MAYNARD; WILSON, 1979; STONER; MAZDYASNA, 1980; ERICSSON; LINDHE, 1984; STETLER; BISSADA, 1987).

A presença desse tecido, por apresentar uma porção de gengiva inserida, influencia a manutenção da saúde gengival e periodontal, contribuindo para a imobilização da margem gengival, para a impermeabilização relativa do tecido marginal e para a dissipação de forças fisiológicas que são exercidas por fibras musculares da mucosa alveolar para os tecidos gengivais (NABERS, 1954; ARIAUDO; TYRVELL, 1957; LANG; LÖE, 1972; EGLI; VOLLMER; RATEITSCHAK, 1975; DORFMAN et al., 1980; SIEGEL, 1984; MACPHEE; COWLEY, 1995; RESENDE, 2004).

Tais características clínicas diferem da mucosa alveolar, móvel e permeável. Portanto a ausência ou uma estreita faixa de mucosa ceratinizada pode predispor ao acúmulo de placa subgengival, devido a mobilidade da margem gengival que facilitaria a penetração bacteriana, agravando-se quando existe a presença de restaurações subgengivais (FRIEDMAN, 1962; LANG; LÖE, 1972; ERICSSON; LINDHE, 1984; GENCO, 1997; LINDHE; NYMAN, 1999).

Em regiões subgengivais a placa bacteriana é dificilmente removida durante a higiene oral realizada pelos pacientes, o mesmo podendo ocorrer até mesmo com profissionais não especializados. Diferente do que ocorre quando existe uma faixa de gengiva inserida, já que esta é composta por conjuntos de fibras colágenas que garantem sua justaposição ao dente, evitando a penetração de micro-organismos e sendo resistente também a possíveis traumas durante a escovação, justificando mais uma vez a necessidade e importância da existência de uma faixa mínima de tecido ceratinizado ao redor dos dentes (ALFANO, 1974; ALFANO et al., 1976; LINDHE; NYMAN, 1999).

Outra característica anatômica relevante em relação à mucosa ceratinizada é que seja espessa o suficiente para manter a saúde e estabilidade do periodonto. O termo “biotipo periodontal” foi introduzido por Seibert e Lindhe (1989) para descrever a espessura vestíbulo-lingual da gengiva, denominando-a de espessa ou fina. Este tecido pode variar dependendo do tipo de dente, da largura da gengiva e grau de inflamação, havendo controvérsias da sua relação com a forma e contorno dentário (OLSSON; LINDHE, 1991; EGER; MÜLLER; HEINECKE, 1996).

Para diferenciar biotipos espessos e finos, foi determinado arbitrariamente o valor numérico de 1 mm (ANDEREGG; METZLER; NICOLI, 1995; HUANG; WANG, 2006; ZIGDON; MACHTEI, 2008), considerado mais confiável do que o método subjetivo de visualizar por “transparência” a sonda periodontal durante a sondagem do sulco gengival (KAN et al., 2010). Não existe, porém, um valor estabelecido na literatura como padrão para diferenciar os biotipos periodontais. No trabalho de Claffey e Shanley (1986) os autores adotaram valores ≤ 1,5 mm como gengiva fina e ≥ 2 mm para gengiva espessa. Já Linkevicius et al. (2009) diferenciaram os sítios com o valor de corte de 2 mm de espessura gengival.

A média de espessura gengival em dentes superiores de indivíduos periodontalmente saudáveis varia entre 0,9 e 1,3 mm com a profundidade de sondagem do sulco gengival não excedendo 3 mm (EGER; MÜLLER; HEINECKE, 1996). De modo geral, a espessura da gengiva vestibular na maxila é maior do que na mandíbula. Gengiva fina variando de 0,7 a 0,9 mm foi encontrada em caninos superiores e em primeiros pré-molares inferiores, dentes com alto risco de recessão gengival (EGER; MÜLLER; HEINECKE, 1996). Esta espessura aumenta progressivamente em ambos os arcos em direção posterior e sofre alteração intra e

inter-individual, com autores relatando variações de 0,76 a 1,28 mm (MÜLLER; EGER, 1997; MÜLLER; HEINECKE, 2002).

Informações sobre a espessura do tecido ceratinizado podem ser bastante desejáveis em diversas situações clínicas, como em casos de recessões gengivais. Indivíduos que apresentam gengiva fina tem maior propensão à recessão gengival após trauma provocado por escovação inadequada ou ainda tratamentos periodontais, ortodônticos, restauradores e procedimentos cirúrgicos com implantes. (CLAFFEY; SHANLEY, 1986; MÜLLER; EGER, 2002; KAN et al., 2010).

Frente a agentes agressores, é possível observar uma resposta tecidual diferente de acordo com a espessura do periodonto de proteção (KAO; FAGAN; CONTE, 2008). Quando a espessura se apresenta diminuída o periodonto está predisposto à ocorrência de recessão gengival se houver margens de restaurações subgengivais, por exemplo, que, além de produzir um trauma operatório direto aos tecidos, podem ainda facilitar o acúmulo de placa subgengival, provocando alterações inflamatórias (WENNSTRÖM; PRATO, 1999). Tecidos ceratinizados estreitos e finos podem contribuir para perda de inserção periodontal (LÖE; ANERUD; BOYSEN, 1992).

Por outro lado, se a gengiva for espessa ela reage às agressões com hiperplasia gengival, retomando sua dimensão original na fase de cicatrização após terapia periodontal (SEIBERT; LINDHE, 1989). Portanto, evidencia-se a importância do periodonto de proteção na cicatrização da ferida, bem como na manutenção do retalho durante a cirurgia plástica periodontal e regenerativa (BALDI et al., 1999; MÜLLER; STAHL; EGER, 2000).

Diversos trabalhos na literatura avaliam e ressaltam a importância, portanto, da espessura da mucosa ceratinizada para o periodonto de proteção, como observado no ensaio clínico realizado por Linkevicius e colaboradores (2009) que avaliou a influência da espessura do tecido gengival sobre a perda óssea crestal ao redor de implantes dentários após um ano de acompanhamento. Os autores instalaram 46 implantes em 19 pacientes, dividindo-os em grupo teste (aproximadamente 2 mm supracrestalmente) e grupo controle (posicionados ao nível ósseo). Antes da colocação do implante, a espessura do tecido ceratinizado foi medida com uma sonda periodontal. Após a cicatrização e confecção de próteses metalocerâmicas, os implantes do grupo teste foram divididos em subgrupos A e B,

de acordo com a espessura do tecido (fino e espesso respectivamente). Os resultados revelaram que houve diferença significativa em termos de perda óssea entre os grupos A (fino) e B (espesso), o que levou os autores a concluírem que a espessura do tecido gengival pode ser considerada como um fator que influencia significativamente a estabilidade marginal do tecido ósseo ao redor dos implantes. Se a espessura do tecido for de 2,0 mm ou menos, pode ocorrer perda óssea crestal até 1,45 mm, apesar da posição supracrestal da interface implante-abutment.

Para os tecidos peri-implantares existem também diversos trabalhos científicos que têm discutido a importância da presença ou não de uma largura mínima adequada de mucosa ceratinizada. Alguns trabalhos têm relacionado uma menor ocorrência de inflamação peri-implantar quando a mucosa ceratinizada está presente (BLOCK; KENT, 1990; BOURI et al., 2008).

Em Toronto, Cox e Zarb (1987) realizaram um estudo prospectivo de 3 anos, utilizando critérios clínicos tradicionais para avaliar a eficácia dos implantes Branemark. Foram avaliados 26 indivíduos que utilizavam próteses apoiadas em 144 implantes. 50% das superfícies dos implantes apresentavam ausência de mucosa ceratinizada, o que levou os autores a sugerirem que a presença de mucosa ceratinizada ao redor dos implantes não é imprescindível para manutenção da saúde peri-implantar.

Em um estudo prospectivo, Block e Kent (1990) correlacionaram a saúde gengival com a presença de mucosa ceratinizada em 772 implantes. Foram avaliados os seguintes fatores: qualidade óssea, presença de deiscências ósseas e exposição precoce dos implantes no período de cicatrização. Os autores afirmaram que a falta de tecido ceratinizado marginal peri-implantar resultou em maior inflamação, podendo ser uma condição de risco para a peri-implantite. Além disso, afirmaram ainda que a presença da mucosa ceratinizada estava fortemente correlacionada com a manutenção óssea de implantes instalados na região posterior da mandíbula.

Warrer et al. (1995) também avaliaram a relação da mucosa ceratinizada com a saúde peri-implantar. Foram instalados implantes em 5 macacos a fim de avaliar a influência do acúmulo de placa na evolução da doença peri-implantar considerando a quantidade de tecido ceratinizado presente. Os resultados demonstraram que sítios com mucosa ceratinizada apresentaram menor perda de

inserção quando comparados aos sítios sem mucosa. Essa destruição peri-implantar causada pelo acúmulo de placa na ausência de mucosa ceratinizada pode ser explicada pela falta de adaptação firme do tecido ao implante, que resultaria em um selamento marginal adequado. Os autores sugeriram que existe um aumento da susceptibilidade à destruição tecidual induzida por placa bacteriana em sítios onde se observa a ausência de mucosa ceratinizada ao redor de implantes.

Chung e colaboradores (2006) avaliaram a importância da mucosa ceratinizada na manutenção de implantes dentários, com diferentes superfícies. Foram avaliados 69 pacientes de ambos os sexos, nos quais foram instalados 339 implantes há pelo menos 3 anos. Os pacientes foram divididos em grupos, comparando implantes de superfície lisa versus implantes de superfície rugosa com diferentes faixas de mucosa ceratinizada (< ou ≥ 2 mm) e de mucosa aderida (< 1 mm ou > 1 mm). Os parâmetros clínicos avaliados foram índice de placa modificado, índice gengival, índice de sangramento modificado, profundidade de sondagem, perda óssea média anual, além da largura da mucosa ceratinizada e da mucosa aderida. Os autores observaram que a ausência de uma faixa de mucosa ceratinizada adequada ao redor dos implantes, especialmente em implantes posteriores, foi associada com maior acúmulo de placa e inflamação gengival, independentemente do tipo de superfície.

Em um estudo transversal, Bouri e colaboradores (2008) avaliaram a existência de associação entre a largura da mucosa ceratinizada e a saúde dos tecidos peri-implantares. Foram avaliados 200 implantes, os quais foram divididos em dois grupos, sendo 110 implantes com mucosa ceratinizada ≥ 2 mm e 90 implantes com mucosa ceratinizada < 2 mm. Os parâmetros peri-implantares incluíram índice de placa, índice gengival, largura da mucosa ceratinizada, espessura de mucosa ceratinizada, nível ósseo radiográfico e sangramento à sondagem. Os dois grupos foram comparados de acordo com cada parâmetro clínico avaliado e os resultados revelaram melhores condições de saúde para o grupo com maior faixa de tecido ceratinizado. A perda óssea radiográfica e o índice de placa foram significativamente maiores para os implantes com uma faixa estreita de mucosa ceratinizada (< 2 mm), os quais também se apresentaram mais propensos ao sangramento após a sondagem. Os autores sugeriram que existe uma

relação entre a largura de tecido ceratinizado e a saúde dos tecidos peri-implantares.

Zigdon e Machtei (2008) investigaram a associação entre mucosa ceratinizada (largura e espessura) e parâmetros clínicos e imunológicos ao redor de implantes dentais. Neste estudo os autores examinaram 63 implantes (3i osseotite) com tratamento de superfície (ataque ácido). Foram observados índice de placa, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem, largura e espessura da mucosa ceratinizada e recessão vestibular. Os autores observaram que áreas com pouca mucosa ceratinizada (≤ 1 mm) mostravam-se mais inflamadas clinicamente e tinham os níveis de Prostaglandina E_2 das amostras do fluido crevicular mais altos. Concluíram que a mucosa ceratinizada ao redor de implantes afeta ambos os parâmetros clínicos e imunológicos da região peri-implantar.

Schrott e colaboradores (2009) investigaram a influência da mucosa ceratinizada na saúde e estabilidade do tecido mole peri-implantar durante um período de 5 anos, em pacientes com próteses fixas tipo protocolo. Foram avaliados 58 pacientes, com 307 implantes instalados. Os autores concluíram que mesmo em pacientes com boa higiene oral e que fossem submetidos regularmente à terapia de manutenção, se a faixa de mucosa ceratinizada fosse estreita e menor do que 2 mm, estes pacientes estavam mais propensos ao acúmulo de placa e sangramento gengival, bem como à recessão vestibular.

Com o objetivo de avaliar a resposta dos tecidos peri-implantares na presença de mucosa ceratinizada, Kim et al. (2009) avaliaram 276 implantes instalados em 100 pacientes, por um período médio de 13 meses. A amostra foi dividida em dois grupos de acordo com a faixa de tecido ceratinizado presente (grupo 1 com MC ≥ 2 mm e grupo 2 com MC < 2mm) e a largura da mucosa ceratinizada foi comparada e avaliada por meio do índice gengival de inflamação, índice de placa, profundidade de sondagem, recessão da mucosa e reabsorção óssea marginal. Entre os parâmetros clínicos avaliados, os autores constataram que a recessão da mucosa e a reabsorção óssea marginal apresentaram aumentos estatisticamente significativos no grupo com faixa de mucosa ceratinizada deficiente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Adibrad, Shahabuei e Sahabi (2009) que, com o objetivo de determinar a associação entre a largura da mucosa ceratinizada e o estado de saúde do tecido de suporte em torno de

implantes que suportam overdentures, avaliaram 66 implantes de acordo com os seguintes parâmetros periodontais: índice gengival, índice de placa, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, recessão da mucosa, nível de inserção periodontal, nível ósseo radiográfico e largura da mucosa ceratinizada. Quando os dados foram dicotomizados pela largura da mucosa ceratinizada (< 2 mm e ≥ 2 mm), os resultados significativamente melhores foram sempre encontrados no grupo com uma faixa maior de mucosa ceratinizada, levando os autores a concluírem que a ausência de mucosa ceratinizada adequada em torno de implantes que suportam overdentures está associada com maior acúmulo de placa e piores condições dos tecidos moles peri-implantares.

Em um estudo prospectivo comparativo, Boynuegri e colaboradores (2013) avaliaram clinicamente e bioquimicamente a importância da mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentais por 12 meses. Foram avaliados os implantes de quinze pacientes desdentados inferiores tratados com overdentures retidas por implantes na mandíbula (4 implantes por paciente). De acordo com a presença de mucosa ceratinizada nas superfícies vestibulares, os implantes foram divididos em dois grupos: implante com o mínimo de 2 mm de MC e implantes sem nenhuma MC. Um total de 36 implantes foram incluídos nas avaliações, sendo 19 implantes em 15 pacientes com pelo menos 2 mm de MC e 17 implantes em 15 pacientes sem nenhum tecido ceratinizado. Os índices clínicos adotados foram índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem e o fluido crevicular peri-implantar foi coletado e 3 períodos diferentes para avaliação da interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). Os resultados deste estudo mostraram que uma faixa adequada de mucosa ceratinizada foi relacionada com um menor acúmulo de placa e inflamação dos tecidos peri-implantares, bem como com quantidades diminuídas de mediadores pró-inflamatórios, sugerindo que a presença de MC pode ser crítica, especialmente para o controle de placa e inflamação dos tecidos peri-implantares.

A recente revisão sistemática de Bassetti et al. (2016a) teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes métodos de aumento/correção dos tecidos moles a fim de aumentar a largura da MC peri-implantar e/ou ganhar volume de tecido mole durante a segunda fase cirúrgica. Como resultado os autores observaram que dependendo da técnica cirúrgica e do material de enxerto utilizado,

o aumento do tecido ceratinizado variou entre 0,20 mm e 9,35 mm. A técnica de retalho de espessura parcial posicionado apicalmente em combinação com enxerto gengival livre ou o uso de um material de enxerto xenógeno foram mais eficazes. Quando se utilizava a técnica do rolo ou a combinação de retalho reposicionado associado a um enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, a média de aumento observada no volume de tecido mole foi de 2,41 mm e 3,10 mm, respectivamente. Dessa forma os autores concluíram que a combinação de retalho posicionado apicalmente com enxerto gengival livre ou enxerto xenógeno parecem proporcionar resultados aceitáveis. Para o aumento de volume de tecido mole peri-implantar a técnica do rolo na maxila ou o enxerto de tecido conjuntivo (tanto na maxila quanto na mandíbula) parecem ser opções de tratamento confiáveis.

Os mesmos autores publicaram outra revisão sistemática (BASSETTI et al., 2016b) onde incluíram mais trabalhos, complementando os dados encontrados anteriormente. Como resultados obtiveram que o retalho de espessura parcial posicionado apicalmente em combinação com um enxerto gengival livre, um enxerto de tecido conjuntivo subepitelial ou um material de enxerto xenógeno foram os mais eficazes. Portanto nos casos de deficiência de tecido mole em torno dos implantes dentários (sejam eles ainda antes da reabertura ou já em função mastigatória), a seleção de uma técnica cirúrgica adequada e de um material de enxerto de tecido mole adequado são de extrema relevância clínica para que se obtenham resultados significativos quando se objetiva aumentar a faixa ou a espessura da mucosa ceratinizada.

Pelo fato de estar em constante contato com os micro-organismos presentes no ambiente bucal, é que alguns estudos têm evidenciado a importância da presença da mucosa ceratinizada ao redor dos implantes como proteção mecânica contra a infecção peri-implantar. A justificativa se dá principalmente devido ao tônus que a alta concentração de fibras colágenas presentes no tecido ceratinizado fornecem, resultando em um selamento circunferencial efetivo que pode favorecer o sucesso a longo prazo dos implantes dentários (SCHROEDER et al., 1981; BRANEMARK; ZARB; ALBREKTSSON, 1985).

Diferente do tecido periodontal, no tecido peri-implantar não há inserção de fibras de tecido conjuntivo, estas por sua vez orientam-se de forma paralela em relação à superfície do implante. Portanto a principal barreira peri-implantar se dá

apenas por meio de hemidesmossomos do epitélio juncional (similares àqueles encontrados na dentição natural), o que torna o sítio peri-implantar mais suscetível à contaminação bacteriana, aumentando o risco de infecção e consequentemente reabsorção óssea (BAUMAN et al., 1993).

A fim de evitar o comprometimento da saúde dos tecidos peri-implantares, a presença de uma interface mais firme entre o tecido mole e o implante pode ser estabelecida pela presença de uma faixa adequada de mucosa ceratinizada. O tecido conjuntivo da mucosa ceratinizada é do tipo colagenoso denso, o que resulta em maior tônus, diferente da mucosa alveolar, com menor quantidade de fibras colágenas, consequentemente menor tônus e maior mobilidade tecidual (TINTI; PARMA-BENFENATI, 1995).

Desta forma, percebemos que as vantagens, bem como a necessidade da presença de tecido ceratinizado na manutenção da saúde periodontal e peri-implantar ainda são bastante discutidas na literatura científica. Diversos estudos mostram que a presença de uma faixa adequada de gengiva inserida, tanto em altura como em espessura, promove a estabilização gengival, auxiliando o selamento da margem gengival ao dente. Consequentemente a saída do fluido gengival via sulco é favorecida, contribuindo, juntamente com os demais aspectos apontados, com a diminuição da penetração de bactérias pela formação de placa bacteriana, seja em casos de higienização oral inadequada, principalmente, ou ainda pela presença de restaurações subgengivais (LANG; LÖE, 1972; STETLER; BISSADA, 1987; LAGOS, 2003; LAGOS et al., 2011).

Um estudo clínico experimental clássico, desenvolvido por Löe e colaboradores (1965) mostrou que quando o indivíduo se abstém da limpeza mecânica dos dentes, os micro-organismos iniciam a colonização da superfície dentária rapidamente e em poucos dias são perceptíveis os primeiros sinais clínicos de inflamação gengival. Contudo, esse quadro inflamatório é reversível a partir do momento em que as medidas adequadas de higiene oral são retomadas (LÖE et al., 1965). A gengivite se desenvolve a partir do acúmulo de placa bacteriana, que pode se limitar à área gengival por muito tempo ou progredir para uma doença periodontal destrutiva, ocasionando perda óssea alveolar, a partir de alterações na condição microbiológica que levam ao aumento da complexidade e heterogeneidade da placa (LINDHE et al., 1975; DARVEAU et al., 1997).

Frente à agressão bacteriana pela presença da placa, o tecido gengival responde com um processo inflamatório, que se manifesta clinicamente com alterações de cor, tamanho, forma e consistência da gengiva e sangramento do sulco gengival, podendo ocorrer durante a higiene bucal (quando do uso do fio dental ou até mesmo durante a própria escovação), com possibilidade de perdas ósseas alveolares como resultado da progressão da doença periodontal (MARIOTTI, 1999).

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias que acometem os tecidos de suporte e sustentação dos dentes, caracterizando-se pela perda de inserção e destruição do tecido ósseo adjacente. São causadas por espécies de micro-organismos considerados periodontopatógenos, que colonizam a superfície dentária supra ou subgengivalmente. A progressão da doença periodontal é contínua, com episódios curtos de exacerbação e remissão em sítios localizados (SOCRANSKY et al., 1984). De semelhante modo, a peri-implantite é uma condição inflamatória que afeta o osso alveolar e os tecidos moles ao redor de implantes em função, podendo resultar na perda de suporte ósseo (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; NOGUEIRA-FILHO et al., 2014).

Estas lesões estão associadas com a colonização dos tecidos periodontais e peri-implantares por biofilmes bacterianos, provocando uma resposta inflamatória regulada por citocinas. As citocinas pró-inflamatórias liberadas por monócitos e macrófagos em resposta a produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos, são associados com a degradação dos tecidos periodontais e peri-implantares. Algumas dessas citocinas são capazes ainda de modificar a resposta inflamatória (NOGUEIRA-FILHO et al., 2014).

Revisões de literatura e revisões sistemáticas recentes (LIN; CHAN; WANG, 2013; BRITO et al., 2014; CHIU et al., 2015) concluíram que, com base nas evidências científicas disponíveis atualmente, a presença de uma faixa adequada de mucosa ceratinizada pode ser necessária pois mostrou estar relacionada a uma melhor condição de saúde dos tecidos peri-implantares. A falta de mucosa ceratinizada adequada ao redor de implantes dentários está associada a um maior acúmulo de placa bacteriana, inflamação dos tecidos peri-implantares, recessão da mucosa, bem como perda de inserção. Sendo assim, em situações clínicas em que o controle adequado da placa não é viável ou a demanda estética dos pacientes é

extremamente alta, a preservação ou a reconstrução da mucosa ceratinizada é benéfica para uma higiene oral mais eficaz pelo paciente e para manutenção da estabilidade dos tecidos moles em torno de implantes dentários. Para alcançar resultados estáveis a longo prazo para terapias de implantes, recomenda-se a consideração individual das estratégias de tratamento para cada área com faixa inadequada de mucosa ceratinizada. Mesmo assim, ainda há necessidade de mais estudos clínicos randomizados controlados que corroborem com estas conclusões.

2.2 O fluido do sulco gengival/peri-implantar e a detecção de mediadores inflamatórios

O fluido gengival consiste num transudado de fluido intersticial do tecido gengival e pode ser coletado no sulco gengival ao redor dos dentes (BRILL; KRASSE, 1958; BRILL, 1959; LOE, 1961; PASHLEY, 1976; LAMSTER et al., 2007). Na doença periodontal esse fluido se transforma em exsudato inflamatório e é composto tanto de substâncias derivadas da estrutura tecidual periodontal do hospedeiro como também de bactérias que colonizam a bolsa gengival (DELIMA et al., 2003; LAMSTER et al., 2007).

O fluido do sulco peri-implantar é um exsudato de mediadores inflamatórios osmoticamente provenientes dos vasos do plexo gengival. A sua composição é semelhante à do fluido gengival, que contém enzimas derivadas do hospedeiro e seus inibidores, mediadores inflamatórios, modificadores da resposta do hospedeiro e produtos de degradação de tecidos (SORSA et al., 2004; WENNSTRÖM et al., 2004; NOGUEIRA-FILHO et al., 2014).

A agressão bacteriana aos tecidos periodontais estimula uma resposta local imune e inflamatória culminando na produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios no tecido por diferentes tipos celulares envolvidos na resposta defensiva do hospedeiro contra patógenos periodontais (STEFFEN et al., 2000; SCHERES et al., 2010; MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; SHIMADA et al., 2013).

Por muito tempo o epitélio tem sido considerado como uma estrutura passiva do periodonto de proteção, apresentando-se como uma barreira protetora a agressões mecânicas, químicas e microbiológicas, como mencionado por Dale

(2002). Em seu trabalho o autor sugeriu uma nova visão periodontal, abordando que o epitélio além de proporcionar uma barreira física contra a infecção, também tem papel ativo na defesa inata do hospedeiro. O autor menciona que as células epiteliais, por estarem em constante contato com produtos bacterianos presentes no biofilme tanto supra quanto subgengival, respondem ativamente a esses estímulos, produzindo peptídeos antimicrobianos com ampla especificidade e também secretando diversas citocinas e quimiocinas, como a IL-8 por exemplo, em resposta à infecção. Células de Langerhans e células dendríticas, presentes no tecido epitelial, também estabelecem uma interação com a imunidade adquirida por meio das citocinas. Ao sinalizar favorecendo a resposta do hospedeiro, observa-se uma contribuição do epitélio para a atração de células inflamatórias, como os neutrófilos por exemplo, o que evidencia sua participação integrando as respostas imunes inata e adquirida no processo de inflamação.

Os peptídios antibacterianos contribuem para homeostasia e proteção dos tecidos do hospedeiro pelo recrutamento de células imune em períodos de saúde e de doença. De maneira geral, a ação desses peptídeos ocorre pela formação de poros na membrana citoplasmática das bactérias, além de contribuir na cicatrização do periodonto à medida que promovem migração e diferenciação epitelial, ativação de receptores de fator de crescimento epidermal, podendo participar, ainda, do processo de angiogênese (GREER; ZENOBIA; DARVEAU, 2013).

O diagnóstico tanto da periodontite como da peri-implantite é basicamente baseado em parâmetros clínicos, como a profundidade de sondagem, o nível de inserção, a presença ou não de sangramento à sondagem e/ou supuração, índice de placa e também achados radiográficos. Contudo, tais parâmetros podem fornecer informações referentes a consequência da doença, evidenciando a destruição dos tecidos periodontais sem elucidar o estado de atividade atual da doença ou o seu prognóstico (SHIMADA et al., 2013). Em razão disso, pela necessidade em identificar um método para prever a progressão da doença ou pelo menos declarar o estado atual da atividade da doença, é que ensaios imunoenzimáticos a partir da coleta de amostras de fluidos, como saliva e fluido do sulco gengival, começaram a ser realizados, tendo se mostrado eficientes em detectar e quantificar os níveis de proteínas nesses fluidos, reproduzindo o que acontece na realidade e tornando

possível uma melhor compreensão dos eventos imune e inflamatórios que ocorrem no tecido periodontal marginal (SHIMADA et al., 2013).

A identificação de marcadores no fluido do sulco gengival tornou-se importante para o diagnóstico e tratamento da doença periodontal (CHAMPAGNE et al., 2003; LOSS et al., 2005; SHIMADA et al., 2013), visto que a composição do fluido sulcular é resultado da interação entre o biofilme bacteriano, que se encontra aderido à superfície dental, e células dos tecidos periodontais, o que acontece de modo semelhante nos tecidos peri-implantares. A análise dos constituintes do fluido fornece um indicador bioquímico quantitativo do metabolismo celular local que reflete o estado de saúde periodontal de um indivíduo (CHAMPAGNE et al., 2003).

Frente a uma injúria ou qualquer invasão bacteriana, o organismo responde de maneira protetora e local por meio da inflamação, quando diversos mediadores celulares como as citocinas, dentre elas as interleucinas e quimiocinas, são liberadas a fim de reagir com receptores específicos das membranas celulares. Como resultado desta interação, diferentes fenômenos podem ser induzidos dependendo da via metabólica a ser ativada nas células alvos (CONSOLARO, 2009).

As quimiocinas e seus receptores são reguladores chave na migração de leucócitos tanto em condições homeostáticas como inflamatórias. Desta forma, quando se objetiva evitar o desenvolvimento de doenças inflamatórias, é essencial que se tenha uma regulação adequada das respostas dependentes de quimiocinas, principalmente àquelas relativas à inflamação (GRAHAM; LOCATI, 2013).

Nas fases iniciais da doença ocorre uma migração leucocitária de polimorfonucleares (PMN), os quais podem ser estimulados por citocinas, como IL-1β, a expressar mediadores que auxiliam no recrutamento e retenção de PMN para o sulco gengival (RYU et al., 2007). Interleucina 1 β (IL-1β) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) são citocinas pró-inflamatórias que estimulam uma série de eventos, incluindo a perda óssea alveolar (BOYNUEGRI et al., 2013). Estudos mostraram que grande parte do dano que ocorre durante a destruição do tecido periodontal pode ser resultado da atividade de IL-1 e TNF (KAO et al., 1995; HOFBAUER et al., 1999; GRAVES; COCHRAN, 2003). Altos níveis de IL-1β e TNF-α tanto no fluido gengival como no fluido peri-implantar têm sido associados com periodontite e peri-implantite por estimularem a reabsorção óssea através da

indução da proliferação de progenitores de osteoclastos maduros e por aumentar a síntese de colagenases (PANAGAKOS et al., 1996; HOFBAUER et al., 1999; ATAOGLU et al., 2002; MURATA et al., 2002; GRAVES; COCHRAN, 2003; KONTTINEN et al., 2006; SCHIERANO et al., 2008).

Tipos celulares do tecido gengival inflamado expressam RNA mensageiro (RNAm) de citocinas inflamatórias, sugerindo o envolvimento desses mediadores no início e progressão da doença periodontal. IL-1, IL-6, IL-8 (Interleucinas 1, 6 e 8) e TNF-α são exemplos típicos de citocinas multifuncionais que estão envolvidas na regulação das respostas imune e inflamatória (MATSUKI et al., 1992).

Já a interleucina 4 (IL-4), por ser uma citocina anti-inflamatória, apresenta uma relação inversa com a condição periodontal, sendo encontrada em níveis elevados no fluido gengival de indivíduos saudáveis, não refletindo atividade destrutiva periodontal (GIANNOPOULOU et al., 2003), além de estar associada com a remissão ou melhora da doença (PRADEEP et al., 2008). A IL-4 é produzida por células T, mastócitos e basófilos e possui múltiplos papéis na imunidade por induzir a proliferação de células T. É capaz de regular negativamente a produção de outras citocinas como IL-1, TNF-α, TNF-β e IL-6 em monócitos do sangue periférico (PRADEEP et al., 2008).

A citocina IL-6 é conhecida por ser um dos maiores mediadores na regulação da resposta imune frente à inflamação, sendo considerada um mediador fundamental em diversas etapas do processo inflamatório. Níveis elevados de IL-6 em tecidos inflamados, como em casos de periodontite e/ou peri-implantite, revelam sua participação estimulando a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Ela atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa e é sintetizada por diversas células, como fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos), linfócitos (células T e B), células do endotélio vascular e fibroblastos, em reposta aos micro-organismos e a outras citocinas, como por exemplo, IL-1 e TNF-α. É a citocina produzida pelo maior número de tipos celulares. Um exemplo importante de sua atuação em células secretoras de imunoglobulinas é a indução da maturação de células B (HEINRICH et al., 1990; ROTHWELL, 1991; MATSUKI et al., 1992; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Entre os vários efeitos pró-inflamatórios atribuídos à IL-6, os mais relacionados ao processo de reparo são a quimioatração sobre neutrófilos em uma

fase mais precoce e a indução mitótica de queratinócitos em uma etapa mais tardia do processo. Além disso a IL-6 exerce atividade mitogênica sobre os queratinócitos contribuindo para a reepitelização da ferida. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A interleucina 8 (IL-8) é uma citocina quimiotática que atua no recrutamento de células de defesa para áreas onde estas são necessárias (LAING et al., 2004; ISAAC et al., 2010). É quimiotática para neutrófilos, ajudando a formar a primeira barreira de defesa do hospedeiro (ZEHNDER et al., 1999; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005) e quando relacionada ao periodonto, além de atuar nas fases iniciais da doença devido à quimiotaxia, também é importante na ativação de metaloproteinases (MMPs), o que resulta na destruição de colágeno na área da lesão (MATSUKI et al., 1992). Sua produção normalmente se dá por monócitos em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, bem como a indução por IL-1 e TNF-α, o que revela sua presença em níveis elevados no fluido gengival de sítios inflamados (MATSUKI et al., 1992).

Outra citocina pro-inflamatória com importante papel na indução e modulação das respostas imune e inflamatória é a MIP-1α (Proteína Inflamatória para Macrófago) (MORANDINI et al., 2010), por ser um potente quimiotático para células mononucleares (LAING et al., 2004; BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Células epiteliais do tecido gengival inflamado são capazes de secretar essa quimiocina, promovendo o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) nas fases iniciais da doença. Esses mesmos leucócitos podem ser estimulados por LPS bacteriano e outras citocinas, como IL-1β, a expressar mais quantidades de MIP-1α, recrutando e retendo PMN no sulco gengival (RYU et al., 2007).

O Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) participa de diversas atividades biológicas juntamente com a IL-1, apresentando propriedades pró-inflamatórias, estimulação de MMP, produção de Prostaglandina E_2 (PGE_2) e reabsorção óssea. Sua secreção se dá por monócitos e fibroblastos frente a estímulos de LPS bacterianos (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999). Níveis mais baixos de TNF-α em implantes com presença de MC foram encontrados quando comparado a implantes que apresentavam ausência de MC, sendo ainda observado um aumento significativo para tais níveis após um período de 12 meses para implantes sem MC (BOYNUEGRI et al., 2013).

Um dos principais estimuladores da formação de novos vasos sanguíneos é o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). Ele é produzido por macrófagos, queratinócitos, osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos gengivais e também do ligamento periodontal. O VEGF induz a angiogênese por meio da formação de estruturas tubulares e proliferação de células endoteliais linfáticas, através de receptores específicos, desempenhando um papel essencial na reparação e regeneração tecidual (ISAAC et al., 2010; NISHI et al., 2010; AGIS et al., 2012).

A redução de mediadores inflamatórios no fluido do sulco gengival envolvidos na iniciação e progressão da doença periodontal pode ser alcançada através de procedimentos clínicos de raspagem e alisamento radicular e até administração sistêmica de antibióticos em pacientes portadores de doença periodontal, demonstrando a efetividade e a importância da terapia periodontal (THUNELL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Sítios estáveis amostrados na cavidade oral de pacientes que possuem outros sítios na fase ativa da doença podem apresentar níveis elevados de mediadores inflamatórios no fluido do sulco gengival com o decorrer do tempo, provavelmente em decorrência da resposta local do hospedeiro como reflexo das alterações sistêmicas da resposta inflamatória (OFFENBACHER; SALVI, 1999). Sítios clinicamente sadios em pacientes com doença periodontal progressiva diferem de sítios sadios em pacientes saudáveis, que provavelmente abrigam uma microbiota, da placa bacteriana, diferente, exibindo uma resposta diferente do hospedeiro (XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000).

Dessa forma, pela importância que a presença de uma faixa adequada de mucosa ceratinizada apresenta, diminuindo a penetração bacteriana no sulco gengival e peri-implantar, por promover um selamento da margem gengival de encontro à superfície do dente ou da prótese, torna-se interessante conhecer se a presença de mucosa ceratinizada, de acordo com a variação em sua quantidade, exerce influência no nível de mediadores inflamatórios detectados no fluido do sulco peri-implantar.

2.3 Parâmetros para monitoramento peri-implantar

Para a obtenção de altos índices de sucesso no tratamento com implantes dentários é necessário que haja uma adequada manutenção da estabilidade e higidez dos tecidos peri-implantares. Portanto, parâmetros clínicos podem ser estabelecidos como métodos quantitativos de diagnóstico, a fim de indicar a condição clínica peri-implantar. O monitoramento sistemático e contínuo dos tecidos peri-implantares é fundamental para o diagnóstico da saúde ou da doença peri-implantar e consequentemente para o êxito do tratamento. (AYUB, 2007).

Com a aparente similaridade clínica e morfológica entre os tecidos periodontais e peri-implantares, há uma tendência em utilizar os parâmetros periodontais para a avaliação do estado clínico dos tecidos peri-implantares. O uso dos parâmetros periodontais tem dois propósitos: descritivo e preditivo. A descrição nos fornece meios de comparação entre os sítios e, longitudinalmente, meios de monitorar o estado de saúde peri-implantar e a eficácia do tratamento. (AYUB, 2007).

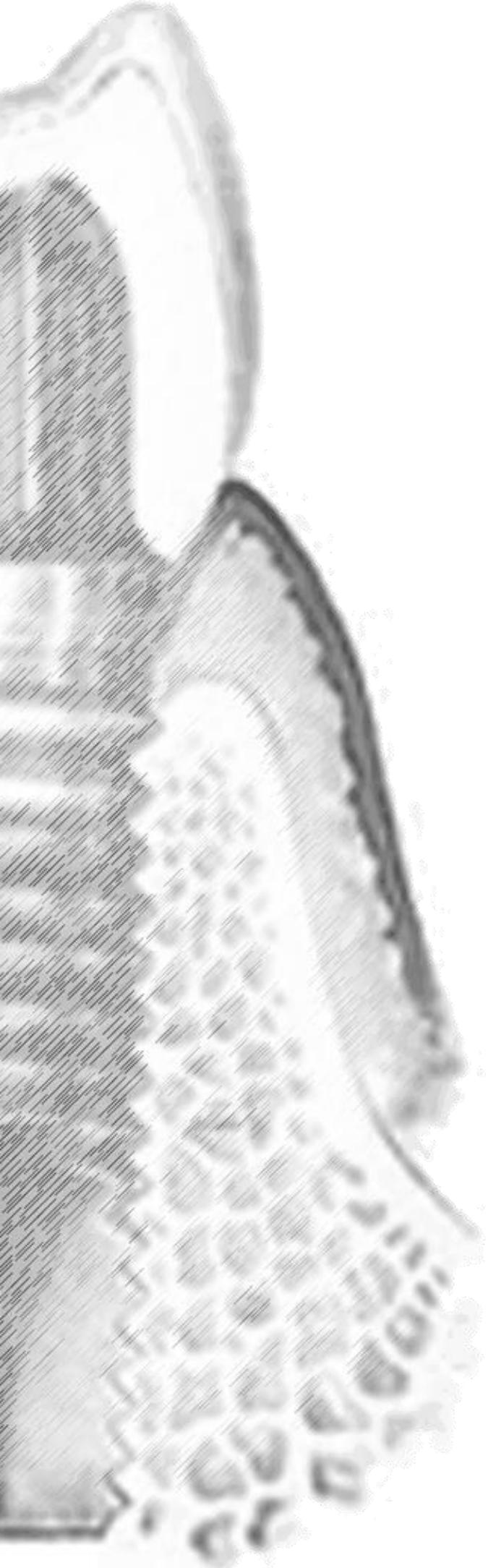
Salvi e Lang (2004) concluíram em sua revisão de literatura sobre parâmetros clínicos, radiográficos e bioquímicos usados para monitoramento das condições peri-implantares que o monitoramento sistemático e contínuo dos tecidos durante a fase de manutenção é recomendado para o diagnóstico precoce da doença peri-implantar. Tais parâmetros que podem ser usados incluem avaliação de placa, condições da mucosa, profundidade de sondagem, largura da mucosa ceratinizada, a análise do fluido sulcular, supuração, mobilidade e desconforto do implante, análise de frequência de ressonância e avaliação radiográfica.

Para Mombelli e colaboradores (1987) a placa bacteriana é considerada como um fator importante para o início do processo inflamatório peri-implantar, com subsequente perda de suporte ósseo marginal. Dessa forma, é importante o monitoramento da higiene bucal por meio de métodos quantitativos de avaliação do acúmulo de placa. Assim, esses autores modificaram o índice de placa original (proposto por Silness e Löe para monitoramento de dentes em 1964) para avaliar a formação do biofilme na área marginal ao redor de implantes ITI e Branemark. Os escores utilizados para determinar o Índice de Placa modificado (IP) são os

seguintes: 0 - sem detecção de placa, 1 - placa detectada passando a sonda ao redor da superfície marginal do implante, 2 - placa pode ser vista a olho nu e 3 - abundância de matéria mole.

Para Mombelli e Lang (1994) a sondagem peri-implantar tem a vantagem de ser um método simples, onde a disponibilidade dos dados é imediata, apresenta habilidade de demonstrar padrões topográficos da doença e tem sido sugerida como um procedimento diagnóstico muito útil. No entanto, é importante reconhecer que as medidas de sondagem refletem mudanças teciduais passadas e apresentam uma reprodutibilidade limitada onde variações de ± 1 mm podem ser esperadas na prática clínica.

Os parâmetros clínicos que podem ser usados para avaliar a saúde dos tecidos ao redor dos implantes dentários incluem: índice de paca modificado (IP), supuração, profundidade de sondagem (PS), nível de inserção (NI), sangramento à sondagem (SS), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada peri-implantar e avaliação radiográfica (AYUB, 2007).



Proposição

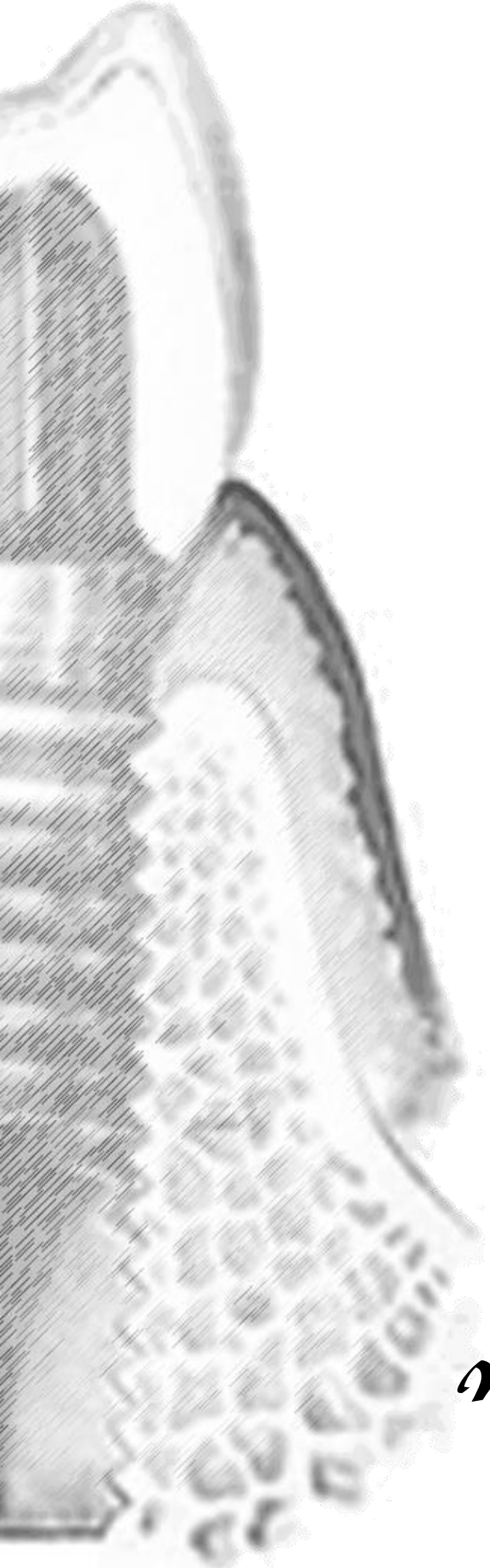
3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo primário

Avaliar a associação entre quantidade e qualidade de MC ao redor de implantes e parâmetros clínicos de saúde/doença peri-implantar e nos níveis de mediadores inflamatórios (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF) presentes no fluido peri-implantar antes e depois da raspagem subgengival peri-implantar.

3.2 Objetivos secundários

- Avaliar a associação entre largura adequada (> 2 mm) ou não (≤ 2mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e parâmetros clínicos de saúde peri-implantar;
- Avaliar a associação entre largura adequada (> 2 mm) ou não (≤ 2mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e os níveis de mediadores inflamatórios presentes no fluido peri-implantar;
- Avaliar a associação entre espessura fina (≤ 1 mm) ou espessa (>1 mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e parâmetros clínicos de saúde peri-implantar;
- Avaliar a associação entre espessura fina (≤ 1 mm) ou espessa (>1 mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e os níveis de mediadores inflamatórios presentes no fluido peri-implantar.
- Avaliar a associação entre espessura fina (≤ 1,5 mm) ou espessa (> 1,5 mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e parâmetros clínicos de saúde peri-implantar;
- Avaliar a associação entre espessura fina (≤ 1,5 mm) ou espessa (> 1,5 mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e os níveis de mediadores inflamatórios presentes no fluido peri-implantar.



Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Para o desenvolvimento deste estudo transversal observacional, quanto aos aspectos éticos, todos os pacientes receberam informações verbais e por escrito quanto a importância, objetivos, benefícios esperados, riscos previsíveis, limitações e procedimentos da pesquisa. Após a leitura cuidadosa e explicação do termo de consentimento (Anexo I), os pacientes que compreenderam a dimensão do estudo e concordaram com a participação, foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), deixando seu consentimento escrito para a realização do mesmo, autorizando as manobras propostas e a divulgação dos resultados. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP-FOB-USP sob o número 1.113.725, em reunião datada de 17/06/2015 (Anexo II).

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram selecionados pacientes inscritos para tratamento odontológico na Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, parcialmente desdentados, voluntários e previamente reabilitados com prótese sobre implante, nas clínicas das Disciplinas de Periodontia e Clínica Integrada Reabilitadora dos Cursos de Graduação e Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Para o cálculo da amostra, dentre as citocinas a serem avaliadas, os valores de média e desvio padrão da variável TNF-α foram utilizados como referência, baseados nos resultados obtidos por Boynuegri et al. (2013). Dessa maneira, para verificar uma variação mínima de 30% na quantidade desta citocina considerada clinicamente relevante e diferente entre os grupos, foi calculada uma amostra de 25 implantes para cada grupo, levando-se em consideração um nível de significância de 5% e o poder do teste de 80%.

O recrutamento inicial dos pacientes foi feito no Setor de Triagem da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, no período de setembro de 2015 a maio de 2016. Foram avaliados para inclusão 1298 prontuários, dos quais foram excluídos 1233 por não apresentarem os critérios de inclusão ou apresentarem um ou mais critérios de exclusão. O exame inicial dos 65 pacientes selecionados resultou na exclusão de mais 31 pacientes por apresentarem um ou mais critérios de exclusão,

os quais não puderam ser identificados nos prontuários, além da exclusão de 10 pacientes que se recusaram a participar do estudo. Sendo assim, após o recrutamento de 24 pacientes, os mesmos foram os responsáveis pela amostra do presente estudo que ficou inicialmente composta por 50 implantes. Todos procedimentos clínicos e de coleta de dados foram realizados na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, no mesmo período mencionado, estendendo-se até julho de 2016.

Os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos pacientes foram: implantes unitários em função por pelo menos 6 meses com sinais clínicos de saúde periodontal e peri-implantar e bom controle de placa. Foram excluídos da amostra: implantes mal posicionados que impossibilitaram a reabilitação protética adequada, implantes sintomáticos, com mobilidade, supuração à palpação (identificada no exame inicial para seleção da amostra), condenados por peri-implantite, implantes com próteses mal adaptadas, presença de doenças sistêmicas não controladas, como Diabetes Mellitus, hipertensão arterial, doença renal crônica, doenças de mucosa oral, hemofilia e outros distúrbios de coagulação, submetidos a terapia com anticoagulantes, imunoestimulatórios ou imunodepressivos, pacientes irradiados e/ou imunodeprimidos, com parafunção severa, abuso de drogas ilícitas ou álcool, fumantes ou os que abandonaram o vício há menos de 6 meses, que foram submetidos a tratamento com antibioticoterapia ou anti-inflamatórios nos 6 meses prévios a realização do estudo, pacientes gestantes ou lactantes e aqueles que não aceitaram participar do estudo.

Os pacientes foram submetidos inicialmente ao exame clínico, ou seja, anamnese e exame físico, incluindo exame periodontal e exame radiográfico. Dessa forma, os sítios incorporados ao estudo foram as faces vestibulares de implantes dentários bem-sucedidos e foram divididos em dois grupos (Figura 1), de acordo com a quantidade (largura) de mucosa ceratinizada adjacente ao implante selecionado. O grupo 1 (G1) foi inicialmente composto por 29 implantes com faixa estreita de mucosa ceratinizada até 2 mm (≤ 2 mm) e o grupo 2 (G2) por 21 implantes com uma faixa de mucosa ceratinizada maior que 2 mm (> 2 mm).

Adicionalmente, como objetivo secundário do presente trabalho, as amostras foram redistribuídas em grupos de acordo com a espessura da MC, a fim de comparar os parâmetros em relação à qualidade tecidual. Dessa forma as

amostras foram alocadas da seguinte maneira: grupo A_1 (GA_1) ≤ 1 mm e grupo B_1 (GB_1) > 1 mm, de acordo com vários trabalhos (ANDEREGG; METZLER; NICOLI, 1995; HUANG; WANG, 2006; ZIGDON; MACHTEI, 2008; KAN et al., 2010); e grupo A_2 (GA_2) ≤ 1,5 mm e grupo B_2 (GB_2) > 1,5 mm, baseando-se nos valores do trabalho de Claffey e Shanley (1986).

4.2 Padronização da amostra

No primeiro contato com os pacientes, período T_1, foram realizadas a coleta do fluido do sulco peri-implantar e as mensurações dos índices clínicos iniciais, que serão descritos posteriormente. Em seguida, na fase do estudo considerada como “baseline”, foi realizado o preparo inicial, com a utilização de aparelho de ultrassom (Profi Neo, Dabi-Atlante) na boca toda do paciente, exceto ao redor do(s) implante(s), raspagem peri-implantar supra e subgengival com curetas de PLASTEEL (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA), e profilaxia com taça de borracha e/ou escova Robson e pasta profilática ambos supra gengivais na boca toda; além de instruções e reforço de higiene oral, a fim de padronizar os grupos da amostra. Após este tratamento, no decorrer de aproximadamente 1 mês, os pacientes mantiveram a higiene e o controle de placa individualmente, sem intervenção profissional, mas devidamente orientados e motivados a realizar os cuidados de acordo com as instruções que receberam, tanto em relação à escovação quanto ao uso do fio dental. Decorrido este período os pacientes foram reavaliados para nova coleta e mensurações, período denominado T_2.

4.3 Coleta do fluido do sulco peri-implantar

A coleta das amostras de fluido do sulco peri-implantar foi realizada na face vestibular dos implantes incluídos no estudo, nos períodos T_1 e T_2, por meio da utilização padronizada de pontas de papel absorvente número 40 (DENTSPLY MAILLEFER). Em ambos os períodos do estudo, os cones de papel foram inseridos no sulco peri-implantar, justaposto à coroa, até que uma leve resistência fosse

sentida, como na técnica de Brill (BRILL, 1959), e mantido em posição por 30 segundos permitindo sua embebição. As amostras visualmente contaminadas com sangue ou saliva durante a coleta foram descartadas.

O procedimento de coleta das amostras foi repetido 6 vezes em cada implante, utilizando novos cones de filtro de papel a cada nova coleta, a fim de garantir uma quantidade suficiente de fluído que permitisse sua análise laboratorial, visto que a inflamação tecidual marginal, presente ou não, resultava em maior ou menor quantidade de fluido crevicular presente, respectivamente, entre os diferentes sítios avaliados. Os filtros de papel contendo as amostras coletadas de fluido do sulco peri-implantar foram colocados em microtubos tipo Eppendorf contendo solução anti-protease diluída preparada de acordo com as recomendações do fabricante (INIBIDOR DE PROTEASE SIGMAFAST – Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e armazenados a -80ºC até a realização do imunoensaio (SHIMADA et al., 2013).

Para o preparo da solução anti-protease, cada comprimido ("Protease Inhibitor Tablet") foi diluído em 100ml de solução PBS (0,4g de KH_2PO_4 + 0,2g de K_2HPO_4 + 100ml de água destilada) resultando na solução concentrada de anti-protease ou pura. Esta solução foi diluída em PBS na proporção 1:10, resultando em 1000ml de solução diluída que poderia ser utilizada durante no máximo 14 dias, armazenada em geladeira, segundo orientações do fabricante contidas na bula do produto.

4.4 Análise dos parâmetros clínicos peri-implantares

A saúde e a estabilidade dos tecidos moles foram avaliadas por um único operador, previamente treinado e calibrado, utilizando: índice de placa modificado (IP) proposto por Mombelli et al. (1987), supuração à sondagem (S), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção relativo (NIR), índice de sangramento à sondagem (IS), quantidade/largura (LMC) e qualidade/espessura (EMC) da mucosa ceratinizada na face vestibular dos implantes, em três sítios por implante (mesial, centro e distal).

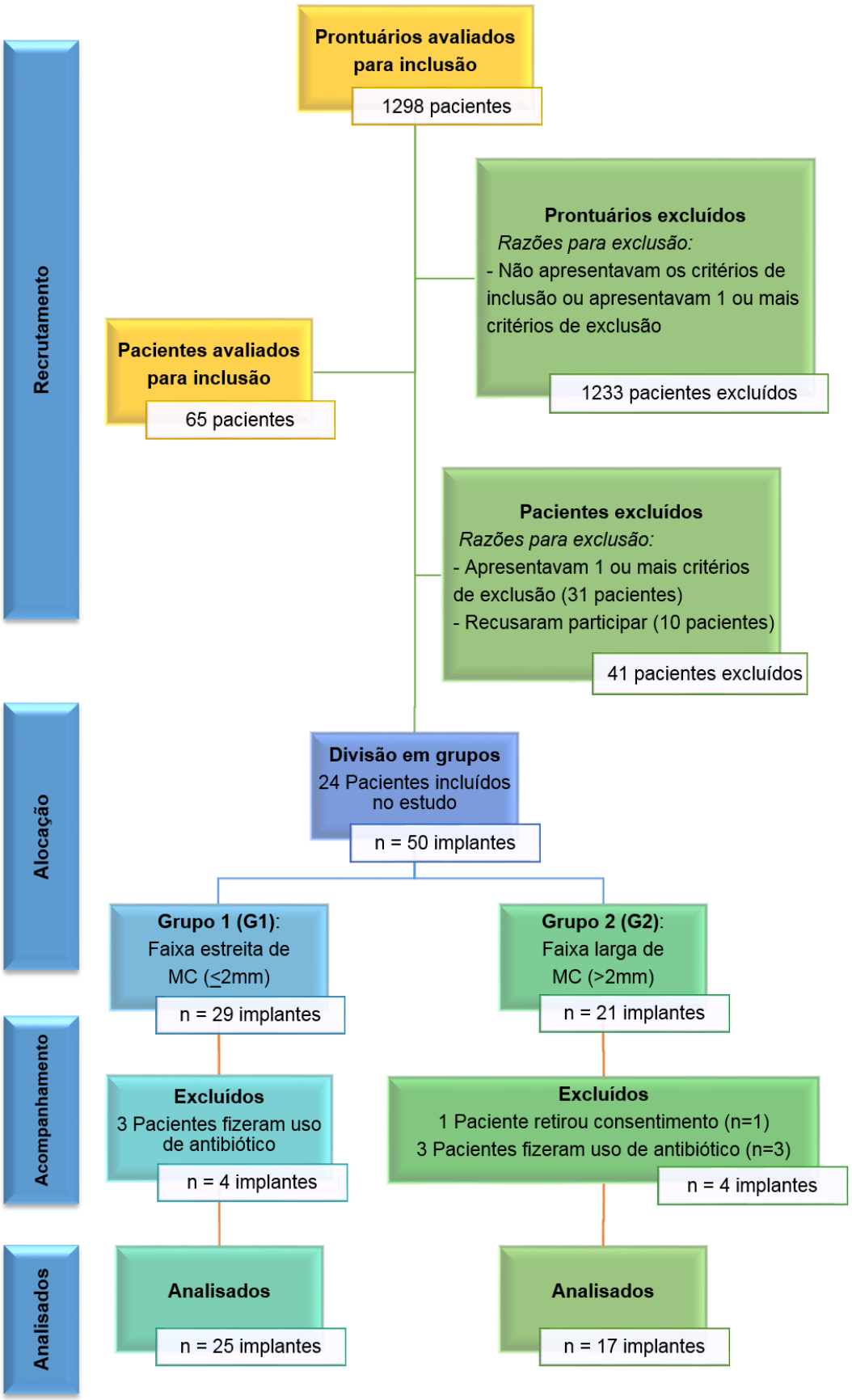


Figura 1 – Diagrama de fluxo de estudo.

A calibração do operador foi realizada por meio da mensuração da PS e altura da mucosa ceratinizada em 3 pontos por implante (mesial, centro e distal na face vestibular avaliada) e espessura da mucosa ceratinizada, em 20 implantes de 14 pacientes diferentes, em dois diferentes períodos de avaliação, com intervalo entre os mesmos de 7 dias, previamente à realização do estudo. O cálculo do erro casual de Dahlberg e cálculo do erro sistemático pelo teste "t" pareado realizados no ensaio de calibração do operador resultaram em valores de $p > 0,05$, como demonstrado no Anexo III, garantindo a reprodutibilidade das medidas e calibração do operador.

Os índices e parâmetros utilizados para registro só foram determinados após a coleta do fluido para que não houvesse contaminação das amostras com sangue e o detalhamento dos mesmos está descrito a seguir:

4.4.1 Índice de Placa modificado por Mombelli et al. (1987) (IP)

Utilizou-se uma sonda exploradora nº 5 (Duflex) para determinação desse índice, e foram anotados os seguintes escores:

0 - Sem detecção de placa;

1 - Placa detectada passando a sonda ao redor da superfície marginal do implante;

2 - Placa pode ser vista a olho nu;

3 - Abundância de matéria mole.

4.4.2 Supuração à sondagem

Presença ou ausência de supuração determinada após a sondagem do sulco peri-implantar.

0 - Ausência de supuração;

1 - Presença de supuração.

4.4.3 Profundidade de Sondagem (PS)

A profundidade de sondagem foi mensurada com uma sonda periodontal milimetrada PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA), com diâmetro da ponta de 0,5 mm, em três pontos por implante (mesial, centro e distal), na face vestibular, com força suave, até que fosse sentida resistência à penetração da sonda no sulco e sem que o/a paciente relatasse dor ou desconforto. Os valores foram obtidos em milímetros (mm).

4.4.4 Nível de Inserção Relativo (NIR)

O nível de inserção relativo teve como referência fixa uma placa oclusal (guia) e o fundo do sulco peri-implantar no centro da face vestibular. Para obtenção das medidas, inicialmente foi realizada moldagem parcial com hidrocolóide irreversível (Alginato) e foram confeccionados modelos em gesso pedra, os quais foram utilizados para a confecção de uma placa oclusal (guia) em resina acrílica estendendo-se um dente para mesial e um dente para distal da coroa sobre implante incluída na amostra, adaptado do trabalho de Gonzalez (2006). A superfície oclusal da guia foi preparada de forma plana e foi confeccionado um sulco vertical de referência fixo correspondendo ao centro da face vestibular de cada implante. Cada placa oclusal foi ajustada intrabucalmente de forma individual para confirmar a localização do ponto de referência.

O sulco vertical na placa oclusal serviu como guia para a localização e angulação da sonda periodontal milimetrada, permitindo a padronização do posicionamento, assim como a superfície oclusal da placa serviu como referência para a padronização das medidas do nível de inserção relativo utilizadas neste estudo. A medida NIR correspondente a distância da superfície oclusal da placa até o fundo de sulco peri-implantar no sítio vestibular foi realizada com uma sonda periodontal milimetrada PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA), sendo os valores obtidos em milímetros (mm).

4.4.5 Índice de Sangramento à Sondagem (IS)

O IS, assim como o índice de sangramento gengival proposto por Ainamo e Bay (1975), foi verificado juntamente com a profundidade de sondagem, avaliando-se a ocorrência ou não de sangramento observado dentro de 10 segundos após a sondagem do sulco peri-implantar.

0 - Ausência de sangramento;

1 - Presença de sangramento.

4.4.6 Largura (LMC) e Espessura (EMC) da Mucosa Ceratinizada

A faixa de mucosa ceratinizada (largura – LMC) foi medida após a determinação da linha mucogengival (BHATIA et al., 2015) e expressa em mm (milímetros), correspondendo à distância da margem gengival à linha da junção mucogengival, medida no centro da face vestibular dos implantes avaliados com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada PCPUNC-15 (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA).

Para determinar a espessura da mucosa ceratinizada (EMC), a região foi previamente anestesiada com gel de anestésico tópico a base de Benzocaína (Benzotop 200 mg/g, DFL). A medida EMC foi realizada por meio da introdução perpendicular de uma agulha gengival curta descartável (TERUMO®) e um cursor endodôntico na mucosa ceratinizada, posicionando-se a mesma no centro da face vestibular e na metade da medida vertical LMC encontrada, de modo a atravessar o tecido mole até tocar uma superfície dura (tecido ósseo e/ou superfície do implante), determinada pela resistência tátil do tecido. Este registro foi transferido para um paquímetro digital (Starret® Indústria e Comércio Ltda., Itu/SP, Brasil) para sua determinação em centésimos de milímetros.

4.5 Dosagem proteica das amostras de fluido do sulco peri-implantar: Método de Bradford

A dosagem de proteínas totais contidas nas amostras coletadas do fluido peri-implantar foi realizada empregando-se o método de Bradford, de acordo com o manual do fabricante (Bio-Rad), por meio de kit comercial. Este procedimento foi realizado para padronização da quantidade de proteína utilizada em cada amostra, como descrito anteriormente, permitindo a correção dos valores totais obtidos de marcadores biológicos a partir do valor de proteínas totais de cada amostra.

Previamente à realização da dosagem proteica, as amostras foram descongeladas e cada Eppendorf (contendo a solução antiprotease e os cones de papel com o fluido peri-implantar coletado) foi agitado por 30 segundos em Agitador de Tubos Vortex (Modelo AP 56 - PHOENIX) em velocidade máxima (3.800 RPM), a fim de extrair o fluido dos filtros de papel e homogeneizá-lo na solução anti-protease. Durante este procedimento as amostras foram mantidas em gelo para evitar o aumento da temperatura e a degradação proteica.

Em uma placa de 96 poços, como padrão foi utilizada a curva da albumina (BSA – Bovine Serum Albumin – 2 mg/ml) diluída em água destilada (Milli-Q), sendo realizadas 14 diluições na proporção 1:2, resultando em valores conhecidos de proteína em cada poço variando de 1000 a 0,2441 µg/ml, conforme esquematizado na Figura 2. Para os demais poços foi aliquotado 1 ml de cada amostra. Para cada 5 µL de padrão ou amostra pipetados em cada poço foram adicionados 250 µL do reagente de Bradford. Após incubação por 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras foram realizadas em leitor de microplaca (SpectraMax 250, Molecular Devices) ajustado para o comprimento de onda de 595 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	3,9062	Amostra 4									
B	500	1,9531	Etc.									
C	250	0,9765										
D	125	0,4882										
E	62,5	0,2441										
F	31,25	Amostra 1										
G	15,625	Amostra 2										
H	7,8125	Amostra 3										

Figura 2 – Placa para dosagem de proteínas totais

4.6 Quantificação dos marcadores biológicos IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF presentes no fluido do sulco peri-implantar

A detecção dos níveis de mediadores inflamatórios solúveis (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF) foi quantificada a partir das alíquotas de cada amostra de fluido do sulco peri-implantar por imunoensaio pela tecnologia Luminex, segundo as instruções do fabricante.

A quantificação dos analitos com tecnologia multiplex foi realizada utilizando-se beads magnéticas fluorescentes acopladas aos anticorpos específicos para cada alvo estudado em uma mesma placa. A placa pré-desenhada (contendo, em duplicata, valores conhecidos como curva padrão e controle) com o painel de citocinas (HCYTOMAG-60K | MILLIPLEX), conforme esquematizado na figura 3, foi lida em um aparelho Luminex (Merk Millipore), previamente preparado, calibrado e estabilizado, em parceria com o laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) e os resultados foram analisados no software do mesmo equipamento sendo expressos em pg/mL de proteína.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	400	QC-2 Controle									
B	0	400	QC-2 Controle									
C	3,2	2000	Amostra 1									
D	3,2	2000	Amostra 2									
E	16	10000	Amostra 3									
F	16	10000	Amostra 4									
G	80	QC-1 Controle	Etc.									
H	80	QC-1 Controle										

Figura 3 – Placa para quantificação das citocinas - Luminex

O detalhamento dos procedimentos laboratoriais realizados está descrito a seguir.

4.6.1 Preparação dos Reagentes para Imunoensaio

A. <u>Preparação das Beads imobilizadas por anticorpos</u>

Cada frasco de beads de anticorpo foi sonicado durante 30 segundos e depois mantido em vortex durante 1 minuto. Foram adicionados 60 µL de cada frasco de beads de anticorpo de todos os alvos pesquisados (IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF) em um frasco de mistura e acrescentado 2,58 ml de diluente, a fim de se obter o volume final de 3 ml. Em seguida o conteúdo foi mantido em vortex para homogeneizar a solução com as beads.

B. Preparação dos Controles de Qualidade

Os controles 1 e 2 foram reconstituídos com 250 µL de água deionizada (água Milli-Q), invertidos várias vezes e mantidos em vortex. Os frascos permaneceram assentados por 5 a 10 minutos, em seguida os controles foram transferidos para tubos de microfiltros de polipropileno devidamente rotulados. A tabela 1 a seguir descreve o intervalo dos valores conhecidos para de controle para cada citocina avaliada durante o estudo, os quais foram utilizados para análise posterior no software, para leitura das placas.

Tabela 1 - Intervalo do controle de qualidade para as citocinas analisadas.

Citocina	Nível do Controle de Qualidade	Valor médio esperado (pg/mL)	Intervalo esperado (pg/mL)
IL-1β	**Controle 1**	141,5	92 – 191
	Controle 2	783,5	509 – 1058
IL-4	**Controle 1**	149	97 – 201
	Controle 2	836	543 – 1129
IL-6	**Controle 1**	152,5	99 – 206
	Controle 2	824,5	536 – 1113
IL-8	**Controle 1**	156,5	102 – 211
	Controle 2	794	516 – 1072
MIP-1α	**Controle 1**	260,5	169 – 352
	Controle 2	1372,5	892 – 1853
TNF-α	**Controle 1**	134	87 – 181
	Controle 2	764,5	513 – 1066
VEGF	**Controle 1**	179,5	117 – 242
	Controle 2	847,5	551 – 1144

C. Preparação de tampão de lavagem (Wash Buffer)

A solução Wash Buffer 10x foi mantida em temperatura ambiente e misturada para homogeneizar todos os sais da solução. Em seguida, foram diluídos 30 mL de tampão de lavagem 10X com 270 mL de água deionizada (água Milli-Q).

D. Preparação da Curva Padrão de Citocina Humana

O Padrão de Citocina Humana foi reconstituído com 250 µL de água deionizada (água Milli-Q), resultando em uma concentração de 10000 pg/mL de padrão para todos os analitos. O frasco foi invertido várias vezes para misturar e mantido em vortex durante 10 segundos. Em seguida foi mantido assentado durante 5 a 10 minutos e transferido para um tubo de polipropileno de microcentrífuga, apropriadamente rotulado. Esta solução foi utilizada como padrão de 10000 pg/mL.

Cinco tubos de polipropileno para microcentrífuga foram devidamente rotulados com as seguintes concentrações: 2000, 400, 80, 16 e 3,2 pg/mL. Em cada um dos cinco tubos foram adicionados 200 µL de Assay Buffer (solução tampão) permitindo a preparação das diluições em série na proporção 1:5, resultando em valores conhecidos de proteína em cada diluição, variando de 0 a 10000 pg/ml. Dessa forma, foram adicionados 50 µL da solução padrão de 10000 pg/mL ao tubo de 2000 pg/mL e misturado bem, em seguida foram transferidos 50 µL do padrão de 2000 pg/mL para o tubo de 400 pg/ml e novamente misturado, seguido da transferência de 50 µL do padrão de 400 pg/mL ao tubo de 80 pg/mL e misturado. Novamente foram transferidos 50 µL do padrão de 80 pg/mL para o tubo de 16 pg/mL e misturado, finalizando com a transferência de 50 µL do padrão de 16 pg/mL para o tubo de 3,2 pg/mL e misturado bem. O padrão 0 pg/mL (Background) foi o próprio tampão de ensaio (Assay Buffer).

As tabelas 2 e 3 e a figura 4 a seguir descrevem detalhadamente os volumes utilizados de solução padrão, água deionizada e solução tampão para o preparo das diluições.

Tabela 2 - Preparo da solução padrão 10x.

Concentração Padrão (pg/mL)	Volume de água deionizada adicionada (µL)	Volume de Padrão adicionado
10000	250	0

Tabela 3 - Diluições em série para o preparo da curva padrão.

Concentração Padrão (pg/mL)	Volume de solução tampão (Assay Buffer) adicionada (µL)	Volume de Padrão adicionado
2000	200	50 µL de 10000 pg/mL
400	200	50 µL de 2000 pg/mL
80	200	50 µL de 400 pg/mL
16	200	50 µL de 80 pg/mL
3.2	200	50 µL de 16 pg/mL

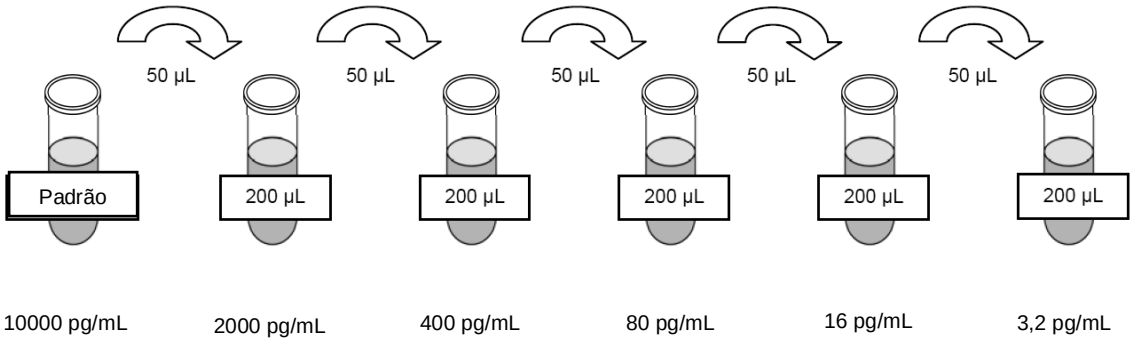


Figura 4 - Esquema das diluições em série para o preparo da curva padrão.

4.6.2 Procedimentos para o Imunoensaio

Previamente a realização do imunoensaio todos os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente (20-25ºC) para serem utilizados. O diagrama para aliquotar a curva padrão, os controles e as amostras em configuração vertical foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante e está esquematizado como foi visto na figura 3.

Inicialmente cada placa de 96 poços teve de ser lavada, utilizando uma lavadora para poços profundos (ELx405 Select Deep Well Washer, BioTek).

Em seguida, foram adicionados 25 µL de cada Padrão ou Controle nos poços apropriados. A solução Assay Buffer (tampão de ensaio) foi utilizada para padrão de 0 pg/mL (Background), como já descrito. Para os poços que receberam as amostras, foram adicionados 25 µL de Assay Buffer e 25 µL de cada amostra. Após agitar em vortex a solução com as beads previamente preparada, foram adicionados 25 µL desta solução em cada poço. As placas foram seladas, enroladas em papel alumínio e incubadas com agitação em um agitador de placas (Cole-Parmer, modelo 51402-00) durante a noite (overnight de 16-18h) a 4°C, a fim de melhorar a sensibilidade do ensaio.

No dia seguinte, o conteúdo de cada poço foi removido cuidadosamente e cada placa foi lavada 2 vezes utilizando uma lavadora de placas magnética (ELx405 Select Deep Well Washer, BioTek), seguindo os ajustes do equipamento descritos nas configurações do mesmo.

Em seguida, 25 µL de anticorpos secundários de detecção foram adicionados em cada poço, sendo que foi permitido que estes se aquecessem à temperatura ambiente antes da adição. Cada placa foi selada, coberta com papel alumínio e incubada com agitação em uma mesa agitadora orbital (AGITADOR KLINE CT-150, CIENTEC), configurada para 70 rpm, durante 1 hora à temperatura ambiente (20-25ºC).

Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 25 µL de Estreptavidina-Ficoeritrina a cada poço contendo os 25 µL de anticorpos secundários. As placas foram novamente seladas, cobertas com papel alumínio e incubadas com agitação em uma mesa agitadora orbital (AGITADOR KLINE CT-150, CIENTEC), configurada para 70 rpm, durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25ºC).

Após este período, o conteúdo de cada poço foi removido cuidadosamente e as placas foram lavadas 2 vezes seguindo as instruções já descritas previamente. Para finalizar, foram adicionados 150 µL de Sheath Fuid (Merck Millipore) em todos os poços. As beads foram ressuspensas em uma mesa agitadora orbital (AGITADOR KLINE CT-150, CIENTEC), configurada para 70 rpm, durante 5 minutos.

Finalizados os procedimentos para preparo das amostras nos poços das placas, estas foram avaliadas através de imunoensaios multiplex para tecnologia Luminex, lidas em aparelho Luminex 200™ ajustado de acordo com as instruções do manual do fabricante. Os valores obtidos para as concentrações das citocinas estudadas foram salvos e tabulados no programa Excel 2013 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA).

4.7 Análise estatística

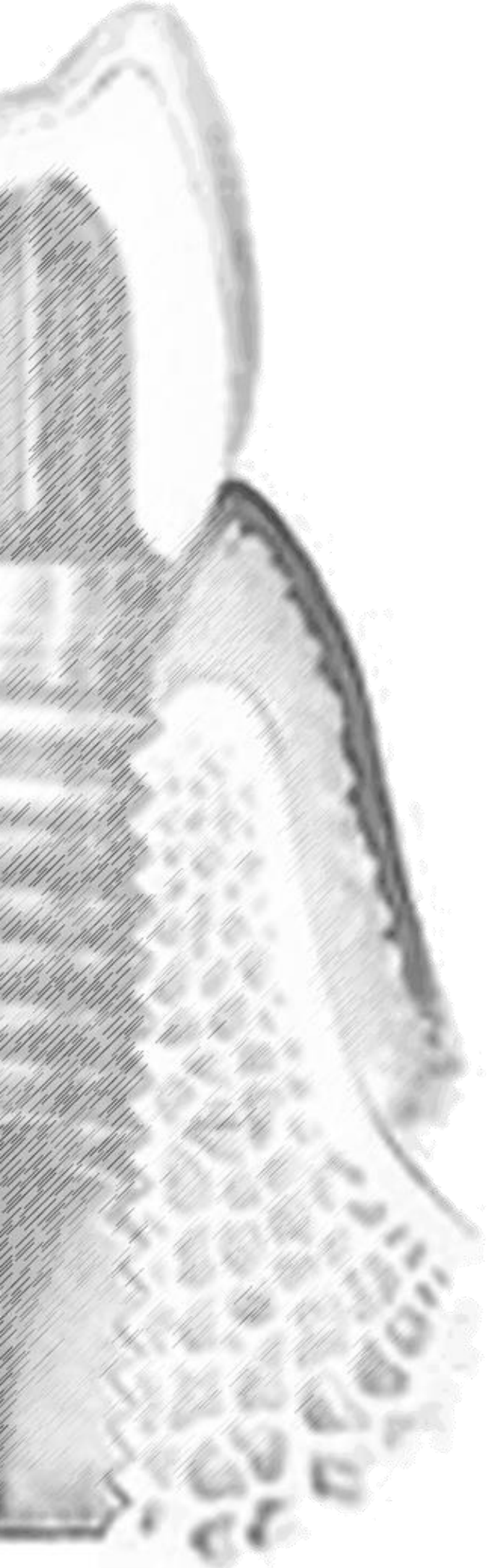
Todos os resultados obtidos foram tabulados no programa Excel 2013 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA), para serem analisados por meio do programa Statistica 7.0 for Windows (StatSoft. Inc.; Tulsa, OK, EUA). Em todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5% (valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância).

Foram analisadas as diferenças intra e inter-grupos, assim como as alterações entre os períodos experimentais (T_1 e T_2).

A dosagem de proteínas totais contidas nas amostras, as quantidades dos mediadores e as demais variáveis clínicas quantitativas avaliadas foram registradas através de médias e desvios padrões e, em seguida, a normalidade dos dados foi verificada através do método Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis medidas em escore foram empregadas a média, a mediana, o 1º quartil e o 3º quartil.

A análise comparativa inter-grupos da quantidade de marcadores biológicos, assim como das demais variáveis quantitativas foi feita através da aplicação do teste “t” de Student, para amostras independentes. Para as variáveis medidas em escore a comparação inter-grupos foi feita através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, assim como para as variáveis quantitativas não normais (que resultaram em $p < 0,05$ no teste de normalidade previamente realizado).

Para a comparação entre os tempos, nas variáveis quantitativas foi utilizado o teste “t” pareado e nas variáveis medidas em escore foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para variáveis quantitativas não normais também foi realizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.



Resultados

5 RESULTADOS

Inicialmente foram avaliados 50 implantes em 24 pacientes (12 homens e 12 mulheres) com idade entre 26 e 80 anos (52,17 ± 11,02), sendo 29 implantes no Grupo 1 (G1 = 29; altura da MC ≤ 2 mm) e 21 no Grupo 2 (G2 = 21; altura da MC > 2 3 mm). No entanto, um paciente abandonou o estudo, retirando o consentimento após as avaliações iniciais, pois se mudou para outro estado e três pacientes tiveram que ser excluídas pois fizeram uso de antibiótico no intervalo entre os tempos da pesquisa. Assim, foram analisados 25 implantes no Grupo 1 e 17 no Grupo 2, ficando a amostra final composta por 42 implantes, conforme descrito na Figura 1, em 20 pacientes (11 homens e 9 mulheres) com idade entre 40 e 80 anos (53,45 ± 10,32). Na tabela 4 estão descritas as características gerais dos pacientes incluídos nos dois grupos, de acordo com a idade, gênero e número de implantes avaliados.

Tabela 4 - Distribuição da amostra por idade (média ± desvio padrão), gênero e número de implantes avaliados.

Grupos	Idade (anos)	Gênero (n)		Número de implantes avaliados
		Masculino (%)	Feminino (%)	
G1	55,96 ± 11,13	18 (42,86%)	7 (16,67%)	25 (59,53%)
G2	56,06 ± 10,68	12 (28,57%)	5 (11,9%)	17 (40,47%)
Geral (implantes)	56 ± 10,82	30 (71,43%)	12 (28,57%)	42 (100%)
Geral (indivíduos)	53,45 ± 10,32	11 (55%)	9 (45%)	20 (100%)

Nos períodos T_1 (avaliação inicial) e T_2 (após 1 mês) foram realizadas mensurações clínicas que avaliaram a qualidade de saúde e estabilidade dos tecidos moles peri-implantares, sendo todos os valores obtidos tabelados para as análises estatísticas, assim como os valores da quantidade de proteínas totais e de cada mediador avaliado encontrado no fluido do sulco peri-implantar. Para os índices medidos em escore foram empregadas a média, a mediana, o 1º quartil e o 3º quartil. Para as variáveis quantitativas foram descritos os valores de médias e desvios padrões, sendo utilizado para verificar a normalidade dos dados o método Kolmogorov-Smirnov. A estatística descritiva dos dados coletados durante o estudo pode ser observada nas tabelas 5 e 6 a seguir.

Tabela 5 - Estatística descritiva para variáveis medidas em escore de toda a amostra (n = 42), de ambos os grupos (G1 e G2).

		Média	Mediana	1º quartil	3º quartil
IP	**T_1**	0,79	1	0	1
	T_2	0,36	0	0	0
S	**T_1**	0,1	0	0	0
	T_2	0,05	0	0	0
ISM	**T_1**	0,57	1	0	1
	T_2	0,38	0	0	1
ISC	**T_1**	0,67	1	0	1
	T_2	0,55	1	0	1
ISD	**T_1**	0,62	1	0	1
	T_2	0,52	1	0	1

Índice de placa modificado (IP), supuração (S), índice de sangramento à sondagem na mesial (ISM), índice de sangramento à sondagem no centro (ISC), índice de sangramento à sondagem na distal (ISD).

Tabela 6 - Estatística descritiva para variáveis quantitativas de toda a amostra (n = 42), de ambos os grupos (G1 e G2).

	Média ± desvio-padrão	
	T_1	**T_2**
PSM	3,55 ± 1,15 mm*	3,4 ± 1,11 mm*
PSC	2,9 ± 1,1 mm*	2,81 ± 1,06 mm*
PSD	3,48 ± 1,17 mm*	3,45 ± 1,33 mm*
NIR	13,29 ± 2,01 mm*	13,38 ± 1,89 mm*
LMC	2,55 ± 1,93 mm*	2,6 ± 1,89 mm*
EMC	1,41 ± 0,48 mm	1,43 ± 0,44 mm
IL-1β	9,54 ± 21,55 pg/ml*	18,01 ± 24,5 pg/ml*
IL-4	38,45 ± 110,14 pg/ml*	57,83 ± 98,58 pg/ml*
IL-6	4,87 ± 8,83 pg/ml*	10,56 ± 15,52 pg/ml*
IL-8	218,57 ± 258,71 pg/ml*	625,20 ± 734,34 pg/ml*
MIP-1α	19,22 ± 30,40 pg/ml*	62,06 ± 89,97 pg/ml*
TNF-α	7,49 ± 9,96 pg/ml*	21,81 ± 32,02 pg/ml*
VEGF	293,78 ± 396,28 pg/ml*	671,38 ± 1443,42 pg/ml*
Proteínas Totais	88,95 ± 58,74 µg/ml	59,54 ± 58,11 µg/ml*

Profundidade de sondagem mesial (PSM), profundidade de sondagem no centro (PSC), profundidade de sondagem distal (PSD) nível de inserção relativo (NIR), quantidade/largura (LMC) e qualidade/espessura (EMC) da mucosa ceratinizada na face vestibular dos implantes. *variáveis não normais (teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov)

Os parâmetros clínicos peri-implantares avaliados durante o estudo, estão descritos na tabela 7 a seguir, de acordo com os grupos G1 e G2, nos dois tempos de avaliação.

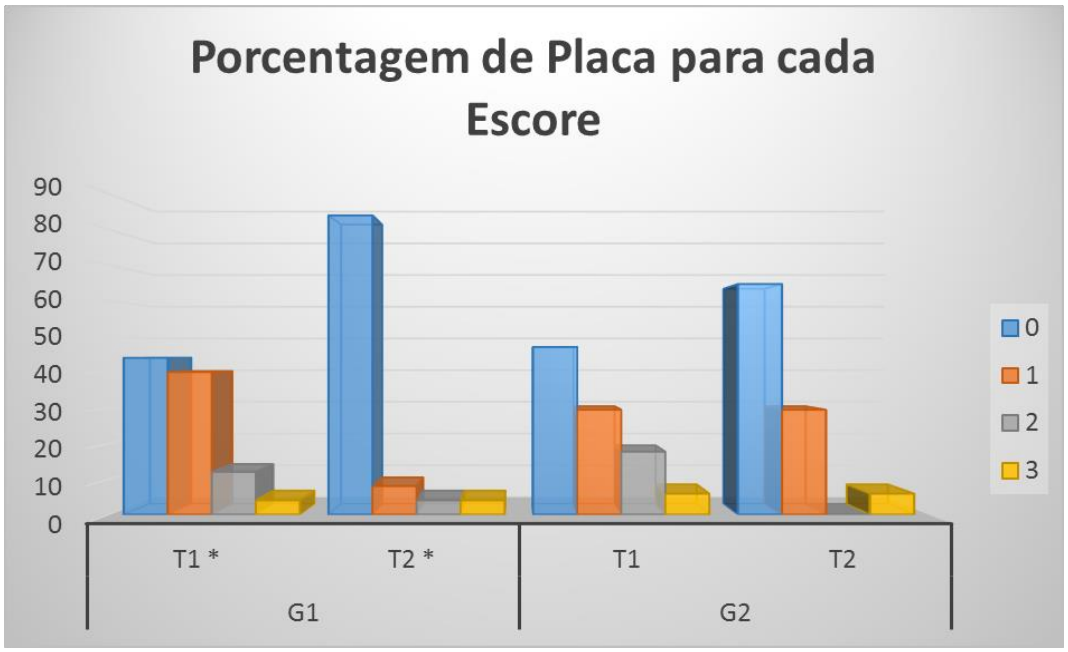
Tabela 7 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos G1 e G2, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada.

Parâmetro	Grupos	T_1	T_2
IP (% implantes)	**G1**	56% [a]	16% [b]
	G2	52,94%	35,29%
S (% implantes)	**G1**	4%	4%
	G2	17,65%	5,88%
PSM (mm)	**G1**	3,44 ± 1,16	3,28 ±1,06
	G2	3,71 ± 1,16	3,59 ± 1,18
PSC (mm)	**G1**	2,96 ± 1,06	2,76 ± 1,09
	G2	2,82 ± 1,19	2,88 ± 1,05
PSD (mm)	**G1**	3,52 ± 1,08	3,28 ± 1,14
	G2	3,41 ± 1,33	3,71 ± 1,57
ISM (% implantes)	**G1**	68% [a]	40% [b]
	G2	41,18%	35,29%
ISC (% implantes)	**G1**	64%	56%
	G2	70,59%	52,94%
ISD (% implantes)	**G1**	68%	52%
	G2	52,94%	52,94%
NIR (mm)	**G1**	13,52 ± 2,02	13,40 ± 2,08
	G2	12,94 ± 1,98	13,35 ± 1,62
LMC (mm)	**G1**	1,40 ± 0,87 [A]	1,60 ± 0,96 [A]
	G2	4,24 ± 1,82 [B]	4,06 ± 1,98 [B]
EMC (mm)	**G1**	1,38 ± 0,47	1,43 ± 0,39
	G2	1,46 ± 0,48	1,44 ± 0,50

Análise inter-grupos - teste “t” de Student e teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste “t” pareado e teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Após a realização dos testes estatísticos, foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos apenas em relação à largura da mucosa ceratinizada, tanto no período inicial (p=0,000000, teste de Mann-Whitney) como no segundo período de avaliação (p=0,000004, teste de Mann-Whitney), visto que este foi o parâmetro adotado como referencial para divisão entre os grupos. Já para análises intra-grupos foi observada diferença estatística significativa entre os períodos de avaliação apenas dentro do grupo 1 em relação ao índice de placa (p=0,025371, teste de Wilcoxon) e ao índice de sangramento na mesial da face vestibular (p=0,038153, teste de Wilcoxon), com diminuição em ambos os índices no decorrer do tempo. O detalhamento do IP encontrado durante as avaliações clínicas, com a descrição das porcentagens para cada escore, está descrito no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Índice de placa (% de implantes) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos 1 e 2.



Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / *p<0,05 para tempo

Os níveis de cada citocina estudada no presente trabalho foram igualmente comparados entre os grupos 1 e 2 e intra-grupo entre os períodos de avaliação. Os dados obtidos dos valores médios e desvios-padrão estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 – Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos G1 e G2, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Proteína	Grupos	T_1	T_2
IL-1β (pg/ml)	G1	11,69 ± 27,22	9,77 ± 12,44 [A]
	G2	6,41 ± 7,78 [a]	30,13 ± 32,29 [bB]
IL-4 (pg/ml)	G1	54,61 ± 141,05	45,48 ± 77,55
	G2	14,58 ± 15,44 [a]	75,99 ± 123,67 [b]
IL-6 (pg/ml)	G1	6,26 ± 11,24	7,67 ± 6,53
	G2	2,84 ± 1,71 [a]	14,82 ± 22,82 [b]
IL-8 (pg/ml)	G1	251,86 ± 267,31	473,09 ± 508,84
	G2	168,54 ± 245,77 [a]	848,89 ± 950,86 [b]
MIP-1α (pg/ml)	G1	23,27 ± 37,96	45,34 ± 56,60
	G2	13,18 ± 12,08 [a]	86,65 ± 121,88 [b]
TNF-α (pg/ml)	G1	9,57 ± 12,37	14,94 ± 15,10
	G2	4,47 ± 2,81 [a]	31,92 ± 45,85 [b]
VEGF (pg/ml)	G1	392,20 ± 477,11	618,21 ± 1660,91
	G2	149,03 ± 153,47 [a]	749,59 ± 1090,87 [b]

Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Após análise comparativa inter-grupos da quantidade de marcadores biológicos, foi observada diferença estatística significativa apenas para a citocina IL-1β, no segundo período de avaliação ($p=0,004631$, teste de Mann-Whitney), com valores maiores encontrados para o grupo 2. Já após a comparação entre os períodos do estudo, todas as variáveis laboratoriais estudadas resultaram em diferença estatística significativa para o grupo 2. A quantidade média de cada citocina avaliada aumentou no decorrer de 1 mês. Os valores de $p < 0,05$ para cada variável podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de média, desvio-padrão e "p" encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo 2, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Parâmetro	T_1	T_2	Valor de p
IL-1β	6,41 ± 7,78 [a]	30,13 ± 32,29 [b]	0,009883
IL-4	14,58 ± 15,44 [a]	75,99 ± 123,67 [b]	0,012947
IL-6	2,84 ± 1,71 [a]	14,82 ± 22,82 [b]	0,001931
IL-8	168,54 ± 245,77 [a]	848,89 ± 950,86 [b]	0,003600
MIP-1α	13,18 ± 12,08 [a]	86,65 ± 121,88 [b]	0,001397
TNF-α	4,47 ± 2,81 [a]	31,92 ± 45,85 [b]	0,000352
VEGF	149,03 ± 153,47 [a]	749,59 ± 1090,87 [b]	0,019118

Teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo

Como avaliação adicional, foram realizadas comparações levando-se em consideração a espessura da mucosa ceratinizada. A distribuição da amostra nos grupos A_1 (EMC ≤ 1mm) e B_1 (EMC > 1mm) está descrita na tabela 10. Assim como realizado anteriormente, para as avaliações inter e intra-grupos, os parâmetros clínicos peri-implantares avaliados durante o estudo tiveram seus valores médios e de desvios-padrão tabelados e estão descritos na tabela 11 a seguir, nos dois tempos de avaliação, de acordo com cada grupo avaliado.

Tabela 10 - Distribuição da amostra para os grupos A_1 e B_1, de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada ≤ 1mm e > 1mm respectivamente.

Grupos	Número de implantes avaliados
GA_1	6 (14,29%)
GB_1	36 (85,71%)
Geral	42 (100%)

Tabela 11 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_1 e GB_1, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada.

Parâmetro	Grupos	T_1	T_2
IP (% implantes)	**GA_1**	66,67%	0%
	GB_1	52,78% [a]	27,78% [b]
S (%implantes)	**GA_1**	16,67%	0%
	GB_1	8,33%	5,56%
PSM (mm)	**GA_1**	2,83 ± 0,41	2,83 ± 0,75
	GB_1	3,67 ± 1,20	3,50 ± 1,13
PSC (mm)	**GA_1**	2,33 ± 0,52	2,17 ± 0,75
	GB_1	3,00 ± 1,15	2,91 ± 1,08
PSD (mm)	**GA_1**	3,17 ± 0,41	3,00 ± 0,63
	GB_1	3,53 ± 1,25	3,53 ± 1,40
ISM (%implantes)	**GA_1**	50%	16,67%
	GB_1	58,33%	41,67%
ISC (%implantes)	**GA_1**	66,67%	16,67% [A]
	GB_1	66,67%	61,11% [B]
ISD (%implantes)	**GA_1**	83,33%	33,33%
	GB_1	58,33%	55,56%
NIR (mm)	**GA_1**	13,00 ± 1,90	12,50 ± 1,76
	GB_1	13,33 ± 2,04	13,53 ± 1,89
LMC (mm)	**GA_1**	2,67 ± 1,51	2,50 ± 1,51
	GB_1	2,53 ± 2,01	2,61 ± 1,96
EMC (mm)	**GA_1**	0,84 ± 0,24 [A]	0,83 ± 0,11 [A]
	GB_1	1,51 ± 0,44 [B]	1,53 ± 0,38 [B]

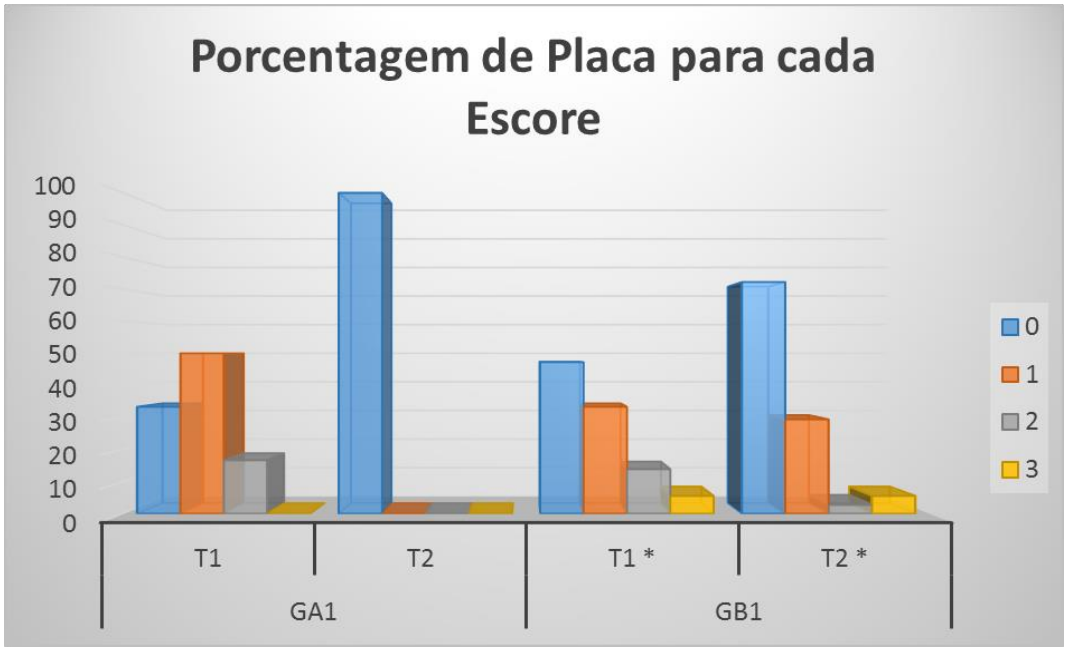
Análise inter-grupos - teste “t” de Student e teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste “t” pareado e teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Após a realização dos testes estatísticos, foi observada diferença estatística significativa entre os grupos em relação à espessura da mucosa ceratinizada, tanto no período inicial (p=0,000711, teste “t” de Student) como no segundo período de avaliação (p=0,000078, teste “t” de Student), visto que este foi o parâmetro adotado como referencial para divisão entre os grupos.

Também foi observada diferença estatística significativa inter-grupos para o sangramento à sondagem no centro da face vestibular no segundo período de avaliação do estudo (p=0,045419, teste de Mann-Whitney), como valores maiores para o grupo B_1. Análise estatística intra-grupos comparando os dois períodos de avaliação revelou diminuição estatística significativa apenas em relação ao índice de placa para o grupo B_1 (p=0,009823, teste de Wilcoxon).

O detalhamento do IP encontrado durante as avaliações clínicas de acordo com os grupos A_1 e B_1, com a descrição das porcentagens para cada escore, está descrito no Gráfico 2 a seguir.

Gráfico 2 - Índice de placa (% de implantes) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos A_1 e B_1.



Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / *p<0,05 para tempo

Ainda em relação a espessura da mucosa ceratinizada, os níveis de cada citocina foram igualmente comparados entre os grupos A_1 e B_1 e intra-grupo entre os períodos de avaliação. Os dados obtidos dos valores médios e desvios-padrão estão descritos na tabela 12.

Tabela 12 – Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_1 e GB_1, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Proteína	Grupos	T_1	T_2
IL-1β (pg/ml)	**GA_1**	4,35 ± 3,89 [a]	17,82 ± 20,96 [b]
	GB_1	10,42 ± 23,16 [a]	18,04 ± 25,30 [b]
IL-4 (pg/ml)	**GA_1**	20,35 ± 24,39	51,30 ± 70,88
	GB_1	41,42 ± 118,59 [a]	58,92 ± 103,24 [b]
IL-6 (pg/ml)	**GA_1**	4,08 ± 2,06	20,55 ± 38,17
	GB_1	5,00 ± 9,52 [a]	8,89 ± 7,35 [b]
IL-8 (pg/ml)	**GA_1**	357,09 ± 357,65	904,03 ± 1101,54
	GB_1	194,98 ± 237,66 [a]	578,73 ± 665,43 [b]
MIP-1α (pg/ml)	**GA_1**	21,33 ± 14,87	108,60 ± 181,89
	GB_1	18,83 ± 32,43 [a]	54,30 ± 65,74 [b]
TNF-α (pg/ml)	**GA_1**	7,65 ± 3,68	26,45 ± 28,48
	GB_1	7,48 ± 10,68 [a]	21,04 ± 32,87 [b]
VEGF (pg/ml)	**GA_1**	253,48 ± 301,29	1201,35 ± 1447,48
	GB_1	300,49 ± 413,12	583,06 ± 1444,00

Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Não houve diferença estatística significativa para nenhuma das citocinas avaliadas quando comparados os dois grupos. Porém, após a comparação entre os períodos do estudo dentro de cada grupo, não foi observada diferença apenas para o VEGF. Todas as demais citocinas apresentaram aumento estatístico significativo dentro do grupo B_1 no decorrer de 1 mês de avaliação. De igual modo foi observada diferença estatística significativa para a citocina IL-1β dentro do grupo A_1 (p=0,046400, teste de Wilcoxon), com aumento observado no segundo período de avaliação. Os valores de $p < 0,05$ para cada variável do grupo B_1 podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de média, desvio-padrão e "p" encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo B_1, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α).

Parâmetro	T_1	T_2	Valor de p
IL-1β	10,42 ± 23,16 [a]	18,04 ± 25,30 [b]	0,026748
IL-4	41,42 ± 118,59 [a]	58,92 ± 103,24 [b]	0,010443
IL-6	5,00 ± 9,52 [a]	8,89 ± 7,35 [b]	0,003305
IL-8	194,98 ± 237,66 [a]	578,73 ± 665,43 [b]	0,004040
MIP-1α	18,83 ± 32,43 [a]	54,30 ± 65,74 [b]	0,002558
TNF-α	7,48 ± 10,68 [a]	21,04 ± 32,87 [b]	0,001084

Teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = p<0,05 para tempo

Adicionalmente, ainda, a amostra foi redistribuída de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada, adotando-se outro valor de corte entre os grupos, na tentativa de melhorar a quantidade de sítios avaliados dentro de cada grupo. Assim, o grupo A_2 foi composto por implantes que apresentavam EMC ≤ 1,5 mm e o grupo B_2 foi composto pelos implantes com EMC > 1,5 mm e novas comparações foram feitas. A distribuição da amostra nos grupos A_2 e B_2 e todos os parâmetros clínicos avaliados estão descritos respectivamente nas tabelas 14 e 15 a seguir.

Tabela 14 - Distribuição da amostra para os grupos A_2 e B_2, de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada ≤ 1,5 mm e > 1,5 mm respectivamente.

Grupos	Número de implantes avaliados
GA_2	24 (57,14%)
GB_2	18 (42,86%)
Geral	42 (100%)

Tabela 15 - Parâmetros clínicos peri-implantares nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos A_2 e B_2, referentes ao índice de placa (IP), supuração (S), profundidade de sondagem (PS), índice de sangramento mesial (ISM), índice de sangramento no centro (ISC), índice de sangramento distal (ISD), nível de inserção relativo (NIR), largura (LMC) e espessura (EMC) da mucosa ceratinizada.

Parâmetro	Grupos	T_1	T_2
IP (%implantes)	**GA_2**	62,50% [a]	20,83% [b]
	GB_2	16,67%	11,11%
S (%implantes)	**GA_2**	4,17%	0%
	GB_2	16,67%	11,11%
PSM (mm)	**GA_2**	3,42 ± 1,02	3,25 ± 0,99
	GB_2	3,72 ± 1,32	3,61 ± 1,24
PSC (mm)	**GA_2**	2,92 ± 1,18 [a]	2,58 ± 1,06 [Ab]
	GB_2	2,89 ± 1,02	3,11 ± 1,02 [B]
PSD (mm)	**GA_2**	3,42 ± 0,83	3,21 ± 1,14
	GB_2	3,56 ± 1,54	3,78 ± 1,52
ISM (%implantes)	**GA_2**	58,33%	45,83%
	GB_2	55,56% [a]	27,78% [b]
ISC (%implantes)	**GA_2**	66,67%	54,17%
	GB_2	66,67%	55,56%
ISD (%implantes)	**GA_2**	70,83%	50,00%
	GB_2	50,00%	55,56%
NIR (mm)	**GA_2**	13,42 ± 2,12	13,21 ± 2,11
	GB_2	13,11 ± 1,88	13,61 ± 1,58
LMC (mm)	**GA_2**	2,08 ± 1,18	2,13 ± 1,08
	GB_2	3,17 ± 2,53	3,22 ± 2,51
EMC (mm)	**GA_2**	1,16 ± 0,30 [A]	1,13 ± 0,21 [A]
	GB_2	1,75 ± 0,45 [B]	1,85 ± 0,29 [B]

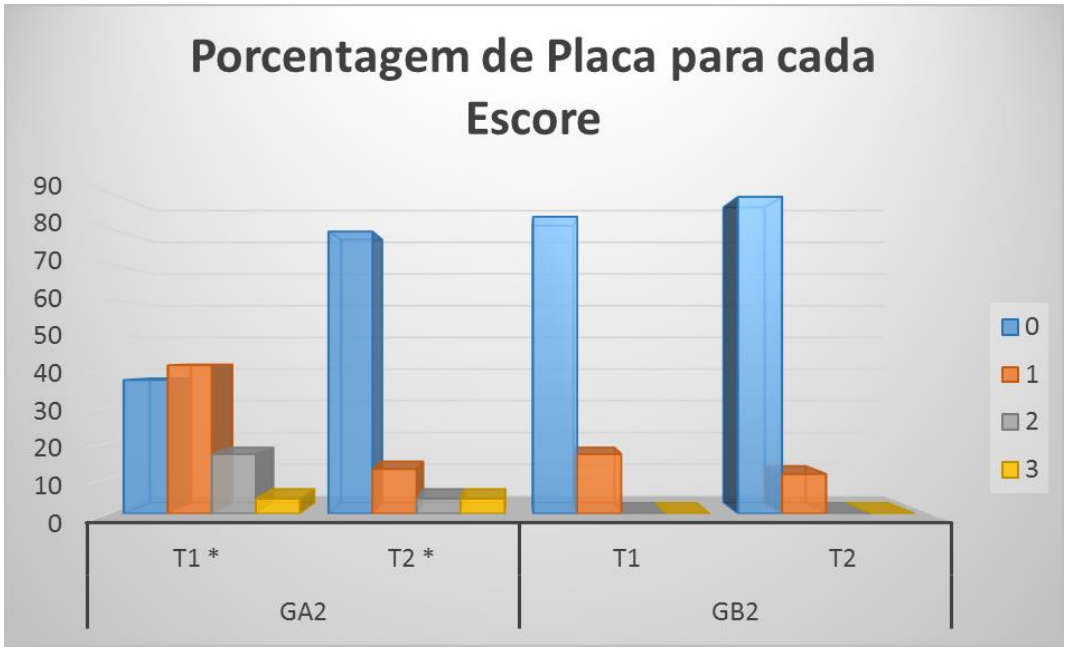
Análise inter-grupos - teste “t” de Student e teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste “t” pareado e teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Após a realização dos testes estatísticos, novamente observamos diferença estatística significativa entre os grupos em relação à espessura da mucosa ceratinizada, tanto no período inicial (p=0,000009, teste “t” de Student) como no segundo período de avaliação (p=0,000000, teste “t” de Student), visto que este foi o parâmetro adotado como referencial para divisão entre os grupos. Também foi observada diferença estatística significativa inter-grupos para a profundidade de sondagem no centro da face vestibular no segundo período de avaliação do estudo (p=0,038323, teste de Mann-Whitney).

Análise estatística intra-grupos comparando as variáveis nos períodos de avaliação revelou diminuição estatística significativa em relação ao índice de placa (p=0,013151, teste de Wilcoxon) e à profundidade de sondagem no centro da face vestibular (p=0,017961, teste de Wilcoxon) para o grupo A_2 e em relação ao índice de sangramento na face mesial (p=0,043115, teste de Wilcoxon) para o grupo B_2.

O detalhamento do IP encontrado durante as avaliações clínicas de acordo com os grupos A_2 e B_2, com a descrição das porcentagens para cada escore, está descrito no Gráfico 3 a seguir.

Gráfico 3 - Índice de placa (% de implantes) investigados no exame inicial (T_1) e após 1 mês (T_2) nos grupos A_2 e B_2.



Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / *p<0,05 para tempo

Nova comparação foi realizada entre os grupos A_2 e B_2 também em relação às citocinas avaliadas, assim como análises intra-grupos foram feitas. Os dados obtidos dos valores médios e desvios-padrão estão descritos na tabela 16.

Tabela 16 – Níveis de mediadores (média ± desvio-padrão) presentes nas amostras de fluido peri-implantar nos dois períodos de avaliação do estudo entre os grupos GA_2 e GB_2, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α), Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Proteína	Grupos	T_1	T_2
IL-1β (pg/ml)	**GA_2**	8,69 ± 24,60 [a]	18,47 ± 28,70 [b]
	GB_2	10,69 ± 17,27	17,40 ± 18,21
IL-4 (pg/ml)	**GA_2**	35,71 ± 119,98 [a]	39,46 ± 44,52 [b]
	GB_2	42,01 ± 98,81	82,32 ± 140,17
IL-6 (pg/ml)	**GA_2**	3,86 ± 4,50 [a]	11,58 ± 19,33 [b]
	GB_2	6,22 ± 12,54	9,20 ± 8,48
IL-8 (pg/ml)	**GA_2**	203,24 ± 257,71 [a]	583,77 ± 714,61 [b]
	GB_2	237,99 ± 266,97 [a]	680,44 ± 777,16 [b]
MIP-1α (pg/ml)	**GA_2**	13,74 ± 11,82 [a]	60,32 ± 101,47 [b]
	GB_2	26,45 ± 44,10	64,39 ± 74,70
TNF-α (pg/ml)	**GA_2**	6,50 ± 7,49 [a]	24,46 ± 39,23 [b]
	GB_2	8,85 ± 12,64	18,29 ± 19,17
VEGF (pg/ml)	**GA_2**	225,40 ± 312,36	480,70 ± 824,47
	GB_2	384,94 ± 480,97	925,63 ± 1996,33

Análise inter-grupos - teste de Mann-Whitney / Análise intra-grupo - teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = $p<0,05$ para tempo / Letras maiúsculas diferentes = $p<0,05$ para grupos

Após comparação entre os grupos, não houve diferença estatística significativa para nenhuma das citocinas avaliadas. Porém, após a comparação entre os períodos do estudo, foi observado aumento estatístico significativo para quase todas as citocinas no decorrer de 1 mês de avaliação, dentro do grupo A_2,

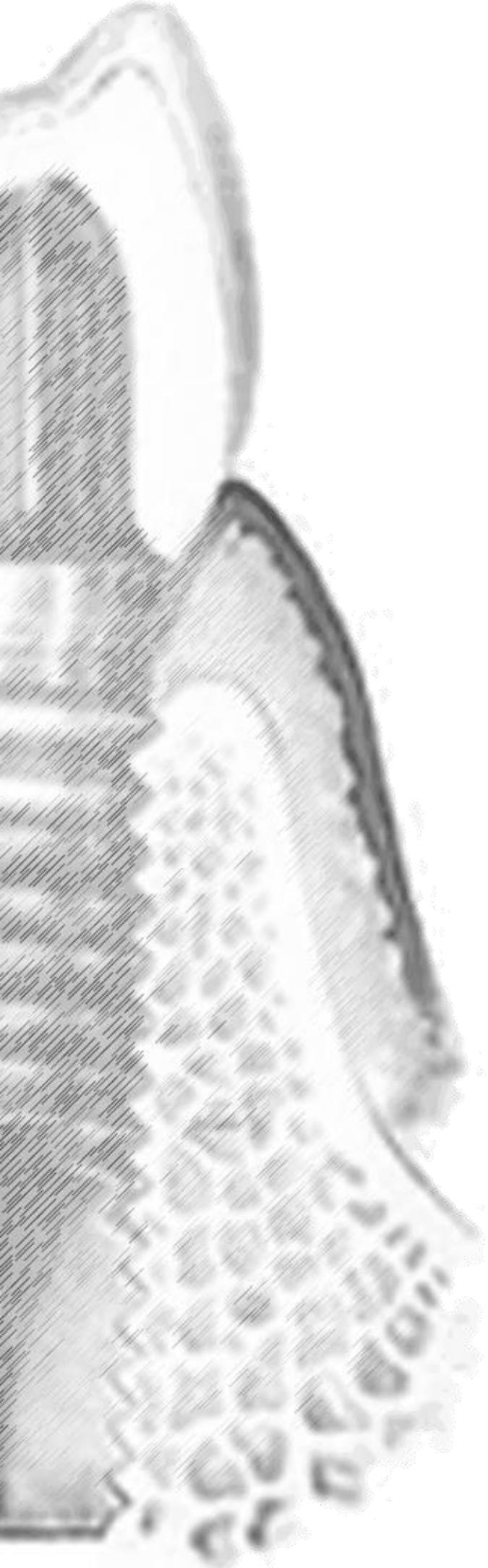
exceto para o VEGF, assim como para a citocina IL-8 dentro do grupo B_2 (p=027858, teste de Wilcoxon). Os valores de $p < 0,05$ para cada variável do grupo A_2 podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de média, desvio-padrão e "p" encontrados após análise comparativa intra-grupo para o grupo A_2, entre os diferentes períodos de avaliação do estudo, referentes a Interleucina 1 β (IL-1β), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Proteína Inflamatória para Macrófago 1 α (MIP-1α) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α).

Parâmetro	T_1	T_2	Valor de p
IL-1β	8,69 ± 24,60 [a]	18,47 ± 28,70 [b]	0,005111
IL-4	35,71 ± 119,98 [a]	39,46 ± 44,52 [b]	0,002700
IL-6	3,86 ± 4,50 [a]	11,58 ± 19,33 [b]	0,003906
IL-8	203,24 ± 257,71 [a]	583,77 ± 714,61 [b]	0,022272
MIP-1α	13,74 ± 11,82 [a]	60,32 ± 101,47 [b]	0,002031
TNF-α	6,50 ± 7,49 [a]	24,46 ± 39,23 [b]	0,001126

Teste de Wilcoxon / Letras minúsculas diferentes = p<0,05 para tempo

Com a finalidade de caracterizar melhor a amostra, de forma descritiva, as informações sobre tipo de conexão protética (hexágono externo, hexágono interno ou cone morse) e tipo de prótese (cimentada ou parafusada) foram coletadas e os resultados encontrados foram os seguintes: inicialmente, dos 50 implantes selecionados, 39 eram do tipo hexágono externo, 4 de hexágono interno e 2 do tipo cone morse, sendo que de 5 implantes não foi possível coletar essa informação. Entretanto, devido a exclusão de 8 implantes, como já justificado anteriormente, foram excluídos da amostra 4 implantes do tipo hexágono externo, 1 implante de hexágono interno, ambos os implantes tipo cone morse e 1 daqueles que não havia informação sobre o tipo de conexão. Em relação ao tipo de prótese, inicialmente 39 eram parafusadas e 11 cimentadas, diminuindo para 32 parafusadas e 10 cimentadas. Em função de a realocação da amostra em grupos levando em consideração tais variáveis não apresentar quantidade adequada para se realizarem testes estatísticos, essas variáveis não foram consideradas no presente trabalho.



Discussão

6 DISCUSSÃO

Diversas são as limitações metodológicas encontradas durante o desenvolvimento de quaisquer pesquisas. Uma das maiores limitações encontradas no presente estudo foi na seleção da amostra. Mesmo tendo sido avaliados mais de mil prontuários para a seleção dos pacientes, menos de 2% puderam ser selecionados para inclusão na amostra do estudo, uma vez que foram adotados critérios de exclusão rigorosos a fim de diminuir as variáveis que pudessem influenciar nos resultados do presente trabalho. Outra limitação bastante relevante foi o elevado custo dos kits laboratoriais necessários para as análises das citocinas, inviabilizando avaliações de mais tempos pós-operatórios. Entretanto, tais limitações não impossibilitaram o desenvolvimento do estudo, permitindo-nos obter resultados relevantes que enfatizam a importância da mucosa ceratinizada.

A partir da análise dos resultados do presente estudo, foi possível observar que existe uma relação entre a quantidade de mucosa ceratinizada e as citocinas avaliadas presentes no fluido do sulco peri-implantar. Tal hipótese surgiu tendo em vista a importância da mucosa ceratinizada como aspecto local importante para manutenção da saúde e estabilidade dos tecidos moles periodontais e peri-implantares.

O número ideal da amostra (n=50) para que se realizasse o presente estudo foi determinado inicialmente por um estaticista. Entretanto algumas amostras tiveram de ser excluídas por motivo de retirada do consentimento por um dos pacientes e uso de antibiótico no intervalo entre os tempos da pesquisa por três pacientes, o que culminou na análise de 25 implantes no Grupo 1 (59,53%) e 17 no Grupo 2 (40,47%), ficando a amostra final composta por 42 implantes em 20 pacientes (71,43% dos implantes estavam instalados em homens e 28,57% em mulheres). Mesmo assim foi possível a realização dos testes estatísticos propostos sem comprometer os resultados do presente trabalho.

Após a realização das análises estatísticas, observamos diferença estatística significativa entre os grupos em relação à largura da mucosa ceratinizada (LMC), tanto no período inicial (p=0,000000) como no segundo período de avaliação (p=0,000004), quando comparados seus valores médios em ambos os grupos (média de 1,40 mm ± 0,87 mm para T_1 e de 1,60 mm ± 0,96 mm para T_2 dentro do

G1, enquanto a média foi de 4,24 mm ± 1,82 mm para T_1 e de 4,06 mm ± 1,98 mm para T_2 no G2) por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, comprovando que os grupos avaliados eram realmente distintos entre si, o que justifica a comparação dos demais parâmetros entre eles. Os valores adotados para esta divisão (G1 ≤ 2 mm e G2 > 2 mm) foram baseados nos resultados do trabalho de Schrott e colaboradores (2009) que também investigaram a influência da mucosa ceratinizada na saúde e estabilidade do tecido mole peri-implantar.

A manutenção de implantes em função mastigatória e em um estado adequado tanto de saúde quanto de estética tornou-se um pré-requisito para o sucesso a longo prazo das reabilitações com implantes. A necessidade de tecido ceratinizado e colagenizado ao redor dos implantes dentários para manter a saúde e a estabilidade dos tecidos mostra-se, portanto, cada vez mais importante. (BASSETTI et al., 2016a, 2016b; PRANSKUNAS et al., 2016).

Os parâmetros clínicos periodontais são de extrema importância para avaliação da saúde e estabilidade dos tecidos que circundam os dentes e também os implantes. São eles que muitas vezes direcionam o tipo de tratamento a ser realizado, frente a alterações patológicas dos tecidos avaliados. Clinicamente, os parâmetros peri-implantares que avaliaram a qualidade de saúde e estabilidade dos tecidos moles peri-implantares no presente trabalho revelaram condições de inflamação tecidual na avaliação inicial com melhora observada após 1 mês, quando observados os valores absolutos de cada parâmetro. Entretanto, de forma estatística significativa, foi possível observar esta melhora apenas na diminuição do índice de sangramento mesial da face vestibular de 68% para 40% (p=0,038153, teste de Wilcoxon) no decorrer do tempo após o preparo inicial, observado dentro do grupo 1. Tal condição de melhora clínica era esperada, já que após as primeiras mensurações foi realizado o preparo inicial com raspagem e orientações de higiene bucal aos pacientes. Este resultado está de acordo com diversos trabalhos na literatura que justificam a raspagem como padrão-ouro da terapia periodontal inicial, sendo considerado efetivo para remoção de micro-organismos periodontais a fim de controlar a progressão da doença (COBB, 2002; CALDERÍN, GARCÍA-NÚÑEZ e GÓMEZ, 2013; PLESSAS, 2014), bem como com a recente revisão sistemática de Suárez-Lopez Del Amo, Yu e Wang (2016) que concluiu que o tratamento não cirúrgico para a mucosite peri-implantar parece ser eficaz.

Após a raspagem o índice de placa naturalmente diminuiu em ambos os grupos, sendo esta diminuição mais evidente quando a faixa de mucosa ceratinizada era menor. Quando realizadas as análises estatísticas intra-grupos entre os períodos de avaliação, foi observada dentro do grupo 1 diferença estatística significativa em relação ao índice de placa (p=0,025371, teste de Wilcoxon), tendo sido encontrado um índice menor da quantidade de placa bacteriana após o preparo inicial (T_1 = 56% e T_2 = 16%). A falta de justaposição do tecido peri-implantar e sua maior mobilidade devido à ausência ou pequena quantidade de mucosa ceratinizada presente e ainda pela menor quantidade de tecido conjuntivo do tipo colagenoso denso e falta de inserção de fibras são características anatômicas que podem facilitar o acúmulo de placa e, portanto, a invasão e proliferação bacteriana intra-sulcular (LANG; LÖE, 1972; BAUMAN et al., 1993; TINTI; PARMA-BENFENATI, 1995; GENCO, 1997; LINDHE; NYMAN, 1999). Desta forma é fundamental que em tais situações de estreita faixa de mucosa ceratinizada seja realizado um controle profissional periódico regular dos pacientes, com intervalos curtos, para que se minimize o acúmulo de placa, como é comumente realizado em trabalhos que defendem a filosofia escandinava periodontal (DORFMAN et al., 1980; LINDHE; NYMAN, 1980; TREY; BERNIMOULIN, 1980; WENNSTRÖM; LINDHE, 1983; KISCH; BADERSTEN; EGELBERG, 1986; WENNSTRÖM, 1987). Contudo, é importante para o paciente que mesmo com intervalos maiores entre as visitas ao profissional, a saúde e estabilidade dos tecidos moles bucais sejam mantidas, o que acontece quando existe uma faixa adequada de mucosa ceratinizada. (LANG; LÖE, 1972; AINAMO; AINAMO, 1978; MAYNARD; WILSON, 1979; STONER; MAZDYASNA, 1980; ERICSSON; LINDHE, 1984; STETLER; BISSADA, 1987).

Considera-se que uma boa higiene bucal é um fator importante na manutenção da saúde peri-implantar e na redução do risco de doença peri-implantar (HEITZ-MAYFIELD, 2008; SERINO; STRÖM, 2009). Vários estudos mostram que o acúmulo de placa foi maior em torno de implantes com faixa estreita de mucosa ceratinizada (menor que 2 mm) (BOURI et al., 2008; ADIBRAD; SHAHABUEI; SAHABI, 2009; BOYNUEGRI et al., 2013). Entretanto não é possível concluir que apenas a falta de mucosa ceratinizada dificulte o processo de remoção da placa, uma vez que existem diversos outros fatores envolvidos que podem influenciar na eficácia do controle de placa, tais como características inerentes ao implante (a

posição de instalação do parafuso, suas características de superfície), à prótese (seu design e características do material de confecção) e ainda ao próprio paciente (habilidades de higiene bucal, grau de comprometimento com o tratamento e motivação para uma boa manutenção da saúde oral) (CHIU et al., 2015).

Desconsiderando, entretanto, esses últimos fatores mencionados, quando os implantes são circundados por mucosa alveolar, por esta ter características de mobilidade, pode haver um prejuízo no desempenho adequado da higiene oral especialmente em áreas com difícil acesso para escovação e pelo fato dos pacientes relatarem certo desconforto e/ou sensibilidade dolorosa ao escovar. O estudo de longo prazo realizado por Schrott e colaboradores (2009) demonstrou que, em pacientes com próteses fixas sobre implantes que receberam manutenção regular, a largura da mucosa ceratinizada não teve efeito sobre o acúmulo de placa nas faces vestibulares, mas foi observado maior acúmulo de placa em implantes nas faces linguais onde a largura da mucosa ceratinizada era menor que 2 mm.

Portanto, nota-se que a presença de uma faixa adequada de mucosa ceratinizada proporciona um ambiente favorável para a higiene bucal realizada pelo paciente. Tal fato parece ser vantajoso principalmente para os casos em que os pacientes apresentam destreza manual reduzida, o que é geralmente observado com o avançar da idade e, apesar de não ter sido o objetivo do presente estudo, foi possível observar clinicamente que alguns pacientes mais idosos a dificuldade de higienização era maior, uma vez que a amostra foi composta por pacientes com idade entre 40 e 80 anos (53,45 ± 10,32).

Tendo em vista os resultados do presente trabalho e de estudos da literatura que enfatizam a importância da mucosa ceratinizada peri-implantar, onde áreas com adequada faixa de MC apresentam melhor comportamento clínico, pode-se extrapolar para a prática clínica a realização de enxertos gengivais que resultem em aumento da faixa de mucosa ceratinizada. Apesar de não ter sido o alvo do presente trabalho, é possível encontrar na literatura estudos que avaliaram este fator. Buyukozdemir Askin et al. (2015) relataram que sítios de implante com mucosa ceratinizada estreita (≤ 2 mm) tinham escore de placa maior do que sítios com mucosa ceratinizada ampla (> 2 mm) e mostraram que o grupo com mucosa ceratinizada estreita apresentou melhora significativa do índice de placa após procedimento de enxerto gengival. Com base nos resultados deste estudo, os

autores sugeriram que enxertos gengivais livres realizados em torno de implantes dentais com falta de mucosa ceratinizada é um método confiável, levando a melhorias significativas nos parâmetros clínicos e inflamatórios. De semelhante modo, é possível observar nas revisões sistemáticas de Bassetti e colaboradores (2016a e 2016b) que o ganho de mucosa ceratinizada ao redor dos implantes favorece a saúde dos tecidos peri-implantares.

Os resultados encontrados no presente estudo reforçam a importância da mucosa ceratinizada peri-implantar e corroboram com outros estudos publicados na literatura científica. De acordo com a revisão sistemática e meta-análise publicada por Lin, Chan e Wang (2013), que teve como objetivo investigar o efeito da mucosa ceratinizada em vários parâmetros relacionados à saúde peri-implantar, a falta de mucosa ceratinizada adequada em torno dos implantes dentários endósseos está associada a um maior acúmulo de placa, inflamação tecidual, recessão gengival e perda de inserção. Este trabalho incluiu 11 estudos (7 transversais e 4 longitudinais) humanos com dados sobre a relação entre a quantidade de mucosa ceratinizada em torno dos implantes dentários e vários parâmetros peri-implantares, com um período de acompanhamento de pelo menos 6 meses e os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas no índice de placa e índice de placa modificado, índice gengival modificado, recessão gengival e perda clínica de inserção, todos favorecendo implantes com larga faixa de mucosa ceratinizada. No entanto, as comparações de outros parâmetros (sangramento à sondagem, índice de sangramento modificado, índice gengival, profundidade de sondagem e perda óssea radiográfica) não atingiram diferenças estatisticamente significativas.

Para mensurar os níveis de citocinas e mediadores concomitantemente em uma amostra, como aqueles presentes no fluido do sulco peri-implantar, uma ferramenta extremamente eficiente que pode ser utilizada é a tecnologia Luminex. Sua utilização oferece importantes vantagens, como a necessidade de limitado volume de amostra para obtenção de múltiplos resultados, a diminuição da demanda do tempo dispensado às atividades laboratoriais, a redução do custo dos reagentes e as variedades de painéis com diferentes marcadores/citocinas já pré-estabelecidos. A fim de comparar os resultados encontrados ao utilizar testes pelas técnicas Multiplex (Luminex) e ELISA (ensaio imunoenzimático), um estudo realizado por Ray et al. (2005) verificou alto grau de concordância entre os testes (correlação

de 84,5%) concluindo que o Luminex é um método eficaz para avaliação imunológica de citocinas e mediadores inflamatórios, justificando, portanto, sua utilização no presente trabalho.

No presente estudo, comparando os dois grupos em relação às citocinas presentes no fluido peri-implantar, após análise estatística foi possível observar diferença estatística significativa apenas para a citocina IL-1β, no segundo período de avaliação (p=0,004631, teste de Mann-Whitney), com valores médios maiores encontrados para o grupo 2 (9,77 pg/ml ± 12,44 pg/ml para G1 enquanto 30,13 pg/ml ± 32,29 pg/ml para G2). Tais dados podem ser justificados pela intervenção profissional realizada durante o trabalho. Os resultados clínicos esperados após a raspagem são de melhora nas condições de saúde teciduais, entretanto microscopicamente a raspagem provoca danos teciduais que podem resultar em alterações biológicas diferentes das esperadas clinicamente. Assim como nos trabalhos de Yoshinari et al. (2004) e Calderín, García-Núñez e Gómez (2013), nos quais foi observado aumento significativo na quantidade de IL-1β após a raspagem, uma citocina importante em relação à expressão de moléculas de adesão durante a maioria dos processos inflamatórios, muitas vezes atuando sinergicamente com o TNF-α. Tais citocinas podem regular a inflamação através de estímulos constantes para a migração celular e para a liberação de mediadores inflamatórios, por meio de feed-back positivo.

A limpeza peri-implantar deve ser eficaz com o mínimo de alteração das superfícies dos abutments, visto que tais superfícies alteradas podem ser fonte de acúmulo de placa que, por sua vez, pode levar ao desenvolvimento de mucosite peri-implantar e peri-implantite. Portanto, durante o preparo inicial para realização de tal procedimento foram utilizadas curetas Implacare™ (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL-USA), desenvolvidas especialmente para manutenção de implantes, com pontas ativas 20% mais finas e com design que permite melhor acesso e adaptação à superfície dos implantes ao realizar a raspagem, possibilitando adequada manutenção e cuidado eficaz dos mesmos. As pontas confeccionadas em Plasteel®, um tipo de resina especial, causam o mínimo de alteração na superfície dos abutments. Sua introdução no sulco peri-implantar, adaptação e movimentos de raspagem foram delicadamente realizados para evitar

possíveis danos também aos tecidos moles, tendo sido realizado o procedimento de igual modo para ambos os grupos.

Como já bem estabelecido na literatura, danos teciduais provocam inflamação, esta por sua vez faz parte do processo de cicatrização, o qual ocorre fundamentalmente em três fases: inflamação, formação de tecido de granulação (fase proliferativa) e remodelação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010). Apesar de estar didaticamente dividido em três fases, o processo de cicatrização acontece com sobreposição e interdependência de cada um dos eventos, desde a inflamação até o reparo, com participação celular, tissular e metabólica. De acordo com cada etapa do processo, determinadas células e mediadores possuem relevância mais destacada. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Portanto, mesmo que muitas vezes imperceptível clinicamente, a nível molecular é possível observar alterações celulares e nos níveis de citocinas, resultando em elevação dos valores de mediadores endógenos encontrados em tais sítios, como foi observado no presente trabalho e em outros trabalhos da literatura (YOSHINARI et al., 2004, CALDERÍN; GARCÍA-NÚÑEZ; GÓMEZ, 2013). Aumentos nos níveis de IL-1 podem ser um reflexo da extensão do traumatismo tecidual e até mesmo da cicatrização tardia dos tecidos (REINHARDT et al., 1993).

Após a comparação dos mediadores inflamatórios entre os períodos de avaliação inicial e após 1 mês da raspagem, foi possível observar diferença estatística significativa para todas as variáveis dentro do grupo 2, com aumento significativo na quantidade média de cada citocina avaliada no decorrer de 1 mês. Os níveis de IL-1β inicialmente eram de 6,41 pg/ml ± 7,78 pg/ml e aumentaram significativamente para 30,13 pg/ml ± 32,29 pg/ml (p=0,009883), a IL-4 aumentou de 14,58 pg/ml ± 15,44 pg/ml inicialmente para 75,99 pg/ml ± 123,67 pg/ml após 1 mês (p=0,012947), a IL-6 aumentou de 2,84 pg/ml ± 1,71 pg/ml para 14,82 pg/ml ± 22,82 pg/ml (p=0,001931), a IL-8 inicialmente apresentava níveis com valores de 168,54 pg/ml ± 245,77 pg/ml e passou a apresentar níveis com valores de 848,89 pg/ml ± 950,86 pg/ml (p=0,003600), a MIP-1α também teve seus níveis aumentados após a raspagem passando de 13,18 pg/ml ± 12,08 pg/ml para 86,65 pg/ml ± 121,88 pg/ml (p=0,001397), o TNF-α teve aumento também significativo de 4,47 pg/ml ± 2,81 pg/ml para 31,92 pg/ml ± 45,85 pg/ml (p=0,000352), assim como o VEGF que

inicialmente apresentava valores de 149,03 pg/ml ± 153,47 pg/ml e passou a apresentar valores de 749,59 ± 1090,87 pg/ml (p=0,019118).

O aumento encontrado nos valores médios das citocinas foi diferente do trabalho de Boynuegri et al. (2013) que, em um estudo prospectivo comparativo onde compararam parâmetros clínicos e também a quantidade de IL-1 β e TNF-α em grupos de implantes com faixas inferiores ou superiores a 2 mm de MC, mostraram diferenças entre os grupos, apontando que uma faixa adequada e maior que 2 mm de MC foi relacionada com quantidades diminuídas de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto diferenças metodológicas entre os estudos impossibilitam a comparação direta entre eles, inclusive em relação ao tempo de acompanhamento. Mesmo assim, a conclusão dos autores de que a presença de MC pode ser crítica, especialmente para o controle de placa e inflamação dos tecidos peri-implantares, também pode ser observada no presente trabalho.

A partir dos resultados encontrados, com aumentos significativos na quantidade de citocinas apenas dentro do grupo com maior largura de mucosa ceratinizada, pode-se especular que a mucosa ceratinizada esteja relacionada com os níveis de tais mediadores inflamatórios, o que se torna expressivo principalmente após uma intervenção profissional. A diferença de reatividade (maior resposta ao estímulo) entre os grupos após o preparo inicial deixa claro que a mucosa ceratinizada exerce influência na resposta imune e inflamatória que se dá tanto frente a estímulos por agentes agressores bacterianos quanto como parte fundamental do processo de reparo (YOSHINARI et al., 2004; CALDERÍN; GARCÍA-NÚÑEZ; GÓMEZ, 2013). Dessa forma espera-se que, com uma maior reação do tecido após a atuação profissional, a resposta clínica para o processo de reparo seja melhor.

Dentro do grupo com faixa estreita de mucosa ceratinizada, o comportamento da IL-1β e da IL-4 foi o oposto, sendo observada diminuição, ainda que não significativa, nos níveis de tais citocinas no decorrer do tempo. Para as demais citocinas avaliadas neste grupo foi possível observar um aumento nos níveis encontrados, porém os valores não foram estatisticamente significativos. Estes achados demonstram, portanto, que a mucosa ceratinizada é capaz de influenciar os níveis de citocinas presentes no fluido peri-implantar e um desequilíbrio entre

citocinas pró e anti-inflamatórias pode estar associado com a progressão da doença nos tecidos moles peri-implantares.

O aumento significativo tanto de citocinas pró-inflamatórias como de citocinas anti-inflamatórias avaliadas neste estudo pode ser explicado por alguns motivos específicos. Inicialmente é possível discutir a terminologia utilizada para descrever tais mediadores endógenos. Em 1998, Kushner publicou um trabalho no qual avaliou semanticamente vários termos utilizados na área biológica e que podem, muitas vezes, ser imprecisos. Dentre eles o autor discutiu a discriminação de citocinas em pró e anti-inflamatórias. O efeito de uma citocina depende da condição local em que esta irá atuar, uma vez que são moléculas de alta complexidade e seus efeitos podem ser inibidos ou realçados por outras citocinas, bem como por hormônios, neuropeptídios, neurotransmissores e moduladores de citocinas. Um exemplo relevante é a IL-6, considerada pró-inflamatória, porém pode ser induzida por citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e também por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF-α.

Dentre as citocinas avaliadas no presente trabalho é importante ressaltar a importância da IL-4, uma citocina anti-inflamatória produzida por células T e capaz de induzir a proliferação dessas mesmas células. É produzida também por mastócitos e basófilos e atua regulando negativamente a produção de outras citocinas como IL-1, TNF-α, TNF-β e IL-6 em monócitos do sangue periférico (PRADEEP et al., 2008), o que demonstra sua associação com a remissão ou melhora da doença periodontal (PRADEEP et al., 2008).

Muitas citocinas são pleiotrópicas, ou seja, uma mesma citocina pode ter várias ações em contextos biológicos diferentes, sobre diferentes células alvo, ou ainda sobrepondo ações reguladores celulares. A resposta celular frente a determinada citocina depende de sua concentração no local, do tipo celular e de outros reguladores celulares a que esta célula está exposta. (GMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997). Sendo assim é possível especular que o aumento de aproximadamente 5 vezes nos níveis de IL-4 dentro do G2, observado no presente trabalho, possa ter sua ação sobreposta às demais citocinas, mesmo às pró-inflamatórias. Tendo em vista que a IL-4 é uma citocina anti-inflamatória e, portanto, seus níveis são mais elevados no fluido gengival de indivíduos saudáveis, não refletindo atividade destrutiva periodontal (GIANNOPOULOU et al., 2003), seu

aumento significativo no grupo 2 com observação de melhora nos parâmetros clínicos avaliados revela sua importância para manutenção da saúde e estabilidade dos tecidos peri-implantares.

Durante o processo de cicatrização, um evento fundamental é a formação de novos vasos sanguíneos. Vários são os sinalizadores que contribuem para a angiogênese, sendo o primeiro deles o VEGF. Tanto macrófagos quanto queratinócitos da região em reparo aumentam pronunciadamente a expressão gênica de VEGF, identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento da cicatrização. Também é observado aumento nos receptores para VEGF nos vasos sanguíneos do tecido de granulação. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010). Aumento significativo de aproximadamente 5 vezes nos níveis de VEGF encontrados no presente estudo revelam alta atividade de reparo no tecido peri-implantar avaliado.

Outra citocina que deve ter sua importância ressaltada nos resultados do presente trabalho é a IL-8, uma citocina quimiotática que tem papel fundamental no acúmulo de leucócitos no local da inflamação. Esta citocina tem capacidade de induzir a migração direcional de células incluindo neutrófilos, monócitos e células T. É produzida por uma ampla variedade de células, incluindo os próprios neutrófilos, monócitos e macrófagos, além de fibroblastos e queratinócitos em resposta aos micro-organismos e também aos mediadores endógenos como IL-1 e TNF. (GMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).

A fim de complementar os resultados do presente trabalho e avaliar também a qualidade tecidual, a amostra foi redistribuída em grupos levando-se em consideração a espessura da mucosa ceratinizada. Depois de realizadas as comparações, foi observada, portanto, diferença estatística significativa entre os grupos em relação à espessura da mucosa ceratinizada (EMC), tanto no período inicial ($p=0,000711$) como no segundo período de avaliação ($p=0,000078$), quando comparados seus valores médios em ambos os grupos (média de 0,84 mm ± 0,24 mm para T_1 e de 0,83 mm ± 0,11 mm para T_2 dentro do GA_1, enquanto a média foi de 1,51 mm ± 0,44 mm para T_1 e de 1,53 mm ± 0,38 mm para T_2 no GB_1) por meio do teste “t” de Student, comprovando que os grupos avaliados eram realmente distintos entre si. O valor de 1 mm adotado para esta divisão ($GA_1 \leq 1$ mm e $GB_1 > 1$

mm) foi baseado em trabalhos publicados na literatura que também levaram em consideração a espessura do tecido ceratinizado, seja para análises periodontais ou peri-implantares (ANDEREGG; METZLER; NICOLI, 1995; HUANG; WANG, 2006; ZIGDON; MACHTEI, 2008; KAN et al., 2010).

Comparações inter-grupos também revelaram diferença estatística significativa para o sangramento à sondagem no centro da face vestibular no segundo período de avaliação do estudo (p=0,045419, teste de Mann-Whitney), como valores maiores para o grupo B_1 (16,67% de sítios apresentaram sangramento no GA_1 enquanto 61,11% dos sítios sangraram no GB_1). Apesar de não estatisticamente significativo, foi possível observar que a profundidade de sondagem nos três pontos avaliados (mesial, centro e distal da face vestibular) apresentaram valores médios menores no grupo com menor espessura de MC quando comparados com o grupo com maior espessura, estando dentro dos valores de normalidade (enquanto para o GA_1 os valores de PSM, PSC e PSD foram 2,83 mm ± 0,41 mm; 2,33 mm ± 0,52 mm e 3,17 mm ± 0,41 mm respectivamente, para o GB_1 as médias encontradas foram 3,67 mm ± 1,20 mm; 3,00 mm ± 1,15 mm e 3,53 mm ± 1,25 mm, respectivamente, para o T_1. Para o T_2 os valores de PSM, PSC e PSD foram 2,83 mm ± 0,75 mm; 2,17 mm ± 0,75 mm e 3,00 mm ± 0,63 mm respectivamente, dentro do GA_1, enquanto 3,50 mm ± 1,13 mm; 2,91 mm ± 1,08 mm e 3,53 mm ± 1,4 mm, respectivamente, para GB_1). Tais achados corroboram com outros trabalhos na literatura, como o de Goaslind et al. (1977) que, avaliando espessura da gengiva livre, observaram um aumento de espessura dos dentes anteriores para os posteriores diretamente proporcional à profundidade do sulco gengival. Mendonça (2001) em sua tese também avaliou a espessura gengival e dentre suas conclusões menciona que a profundidade de sondagem do sulco gengival é tanto maior quanto for a espessura da mucosa ceratinizada, de acordo também com os dados encontrados no presente trabalho.

Análise estatística intra-grupos comparando os dois períodos de avaliação revelou diminuição estatística significativa apenas em relação ao índice de placa que passou de 52,78% no T_1 para 27,28% no T_2 para o grupo B_1 (p=0,009823, teste de Wilcoxon). A diminuição no índice de placa observada do período inicial para o segundo período de avaliação era esperada e é novamente justificada pelos procedimentos de raspagem e orientações de higiene bucal realizados no preparo

inicial. Apesar de visualmente a diferença dentro do grupo A_1 parecer maior (diminuição de 66,67% para 0%, também observada no gráfico 2) não houve diferença estatística significativa, visto que o tamanho da amostra para este grupo ficou muito reduzido (apenas 6 implantes). Em estatística, não há problemas em fazer análises comparativas entre grupos com tamanhos diferentes, entretanto análises intra-grupo com amostra muito pequena impossibilita a detecção de diferenças menores. No presente trabalho, das 6 amostras analisadas dentro do GA_1, 2 delas mantiveram o escore 0 para o IP e em apenas 4 amostras foi observada redução do índice (passaram de escores 1 e 2 no período inicial para 0 no segundo período de avaliação). Portanto a redução (em apenas 4 amostras) não foi estatisticamente significativa.

Em relação aos níveis de cada citocina comparados no presente trabalho, não houve diferença estatística significativa para nenhuma delas quando comparados os dois grupos A_1 e B_1. Comparações intra-grupo entre os períodos de avaliação revelaram diferença estatística significativa apenas para a citocina IL-1β dentro do grupo A_1 (p=0,046400, teste de Wilcoxon), com aumento observado no segundo período de avaliação, passando de 4,35 pg/ml ± 3,89 pg/ml no T_1 para 17,82 pg/ml ± 20,96 pg/ml no T_2. Para as citocinas do GB_1 foi observado aumento estatístico significativo no decorrer de 1 mês de avaliação em todas as variáveis, exceto VEGF. IL-1β aumentou de 10,42 pg/ml ± 23,16 pg/ml no T_1 para 18,04 pg/ml ± 25,30 pg/ml no T_2 (p=0,026748); IL-4 aumentou de 41,42 pg/ml ± 118,59 pg/ml no T_1 para 58,92 pg/ml ± 103,24 pg/ml no T_2 (p=0,010443); IL-6 aumentou de 5,00 pg/ml ± 9,52 pg/ml no T_1 para 8,89 pg/ml ± 7,35 pg/ml no T_2 (p=0,003305); IL-8 aumentou de 194,98 pg/ml ± 237,66 pg/ml no T_1 para 578,73 pg/ml ± 665,43 pg/ml no T_2 (p=0,004040); MIP-1α aumentou de 18,83 pg/ml ± 32,43 pg/ml no T_1 para 54,30 pg/ml ± 65,74 pg/ml no T_2 (p=0,002558) e TNF-α aumentou de 7,48 pg/ml ± 10,68 pg/ml no T_1 para 21,04 pg/ml ± 32,87 pg/ml no T_2 (p=0,001084) quando comparadas por meio do teste de Wilcoxon.

Pode-se especular, a partir destes resultados, que deve existir uma diferença de reatividade entre os grupos de acordo com a qualidade tecidual. Entretanto, observando os valores absolutos dos níveis de citocina encontrados, nota-se que houve aumento em todas as médias encontradas do primeiro para o segundo período de avaliação. Portanto, assim como já mencionado, pelo fato de a

amostra dentro do GA_1 ser muito pequena, tais diferenças podem não ter sido provadas estatisticamente. Este foi o motivo pelo qual as amostras foram novamente distribuídas em diferentes grupos, levando-se em consideração um valor de corte maior para a divisão desses grupos, relativamente à qualidade da MC (espessura).

Desta forma, ainda de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada, a amostra foi separada nos grupos $A_2 \leq 1,5$ mm e $B_2 > 1,5$ mm. Os valores adotados para esta divisão foram baseados no trabalho de Claffey e Shanley (1986) que dicotomizaram sua amostra de acordo com a espessura da mucosa ceratinizada adotando valores ≤ 1,5 mm para denominar o grupo com tecido fino e valores ≥ 2mm para denominar o grupo com tecido espesso. Para que amostras dentro do intervalo entre 1,5 mm e 2,0 mm não fossem perdidas no presente trabalho, visto que as medidas foram precisamente tomadas utilizando um paquímetro digital para sua determinação em centésimos de milímetros, foi considerado o valor de corte 1,5 mm.

A distribuição da amostra nos grupos A_2 e B_2 ficou mais equilibrada (57,14% da amostra foi alocada no GA_2 42,86% no GB_2). Assim novas comparações foram realizadas e os resultados revelaram diferença estatística significativa entre os grupos em relação à espessura da mucosa ceratinizada, tanto no período inicial (p=0,000009, teste "t" de Student) como no segundo período de avaliação (p=0,000000, teste "t" de Student), quando comparados seus valores médios em ambos os grupos (média de 1,16 mm ± 0,30 mm para T_1 e de 1,13 mm ± 0,21 mm para T_2 dentro do GA_2, enquanto a média foi de 1,75 mm ± 0,45 mm para T_1 e de 1,85 mm ± 0,29 mm para T_2 no GB_2) por meio do teste "t" de Student, novamente comprovando a diferença entre os grupos.

Mesmo após a divisão da amostra nos grupos A_2 e B_2, ainda foi possível observar diferença em relação à profundidade de sondagem. Os valores de PSM, PSC e PSD apresentaram-se novamente maiores dentro do GB_2, ainda que em valores absolutos e não de forma estatisticamente significante. Apenas para a profundidade de sondagem no centro da face vestibular no segundo período de avaliação do estudo foi observada que esta diferença era estatisticamente significativa (p=0,038323, teste de Mann-Whitney), apresentando-se com valores médios de 2,58 mm ± 1,06 mm para o GA_2 e medidas maiores para o GB_2, com média de 3,11 mm ± 1,02 mm. A relação diretamente proporcional entre o aumento da espessura gengival e o aumento da profundidade de sondagem encontrada no

presente trabalho está de acordo com achados publicados na literatura (GOASLIND et al., 1977; MENDONÇA, 2001).

Já para as comparações intra-grupos, a análise estatística revelou diminuição significativa de 62,50% no T_1 para 20,83% no T_2 em relação ao índice de placa (p=0,013151, teste de Wilcoxon) assim como diminuição significativa de 2,92 mm ± 1,18 mm no T_1 para 2,58 mm ± 1,06 mm no T2 em relação à profundidade de sondagem no centro da face vestibular (p=0,017961, teste de Wilcoxon) para o grupo A_2. Dentro do grupo B_2 a redução estatística significativa de 55,56% para 27,78% foi observada apenas em relação ao índice de sangramento na face mesial (p=0,043115, teste de Wilcoxon). Novamente, tais achados já eram esperados e corroboram com os demais resultados das comparações nos demais grupos do presente trabalho, sendo observada redução nos parâmetros clínicos e melhora clínica na saúde dos tecidos peri-implantares após a intervenção profissional.

Finalizando as comparações, também foram comparados os grupos A_2 e B_2 em relação às citocinas avaliadas, revelando de igual modo que não houve diferença estatística significativa entre eles. Após a comparação entre os períodos do estudo dentro de cada grupo, foi observado novamente aumento estatístico significativo para quase todas as citocinas, exceto para o VEGF, no decorrer de 1 mês de avaliação, porém desta vez sendo observado dentro do grupo com menor espessura de tecido ceratinizado (GA_2). A citocina IL-1β apresentou aumento de 8,69 pg/ml ± 24,60 pg/ml no T_1 para 18,47 pg/ml ± 28,70 pg/ml no T_2 (p=0,005111), IL-4 aumentou de 35,71 pg/ml ± 119,98 pg/ml no T_1 para 39,46 pg/ml ± 44,52 pg/ml no T_2 (p=0,002700); IL-6 aumentou de 3,86 pg/ml ± 4,50 pg/ml no T_1 para 11,58 pg/ml ± 19,33 pg/ml no T_2 (p=0,003906); IL-8 aumentou de 203,24 pg/ml ± 257,71 pg/ml no T_1 para 583,77 pg/ml ± 714,61 pg/ml no T_2 (p=0,022272); MIP-1α aumentou de 13,74 pg/ml ± 11,82 pg/ml no T_1 para 60,32 pg/ml ± 101,47 pg/ml no T_2 (p=0,002031) e TNF-α aumentou de 6,50 pg/ml ± 7,49 pg/ml no T_1 para 24,46 pg/ml ± 39,23 pg/ml no T_2 (p=0,001126) quando comparadas por meio do teste de Wilcoxon. No GB_2 apenas a citocina IL-8 demonstrou aumento estatístico significativo (p=027858, teste de Wilcoxon) passando de 237,99 pg/ml ± 266,97 pg/ml no T_1 para 680,44 pg/ml ± 777,16 pg/ml no T_2. Podemos especular a partir de tais achados que o número da amostra possa ter interferido nos resultados, visto que nesta nova realocação da amostra, apesar de melhor distribuída entre os

grupos, o n menor se deslocou para o grupo B_2 e não havia sido feito cálculo estatístico inicialmente para determinação do n levando-se em consideração a espessura do tecido, visto que este foi um objetivo secundário do presente estudo.

Outro fator que pode ter contribuído para esta diferença nos resultados é a largura da mucosa ceratinizada. Como não houve diferença estatística significativa entre os grupos para as comparações feitas entre a altura e a espessura da mucosa ceratinizada, percebemos que não existiu uma relação direta entre estes parâmetros. Dessa forma, é possível que dentro de um grupo com menor espessura de MC possa existir altura de MC diferentes entre si, bem como para o grupo com maior espessura. Na realocação das amostras aumentando o valor de corte entre os grupos de acordo com a espessura da MC, pode ter havido uma redistribuição das amostras de forma diferente em relação à altura da MC. Portanto, se a altura da MC realmente influencia na quantidade das citocinas avaliadas dentro do fluido do sulco peri-implantar, a divisão dos grupos de acordo com a espessura de MC sem levar em consideração sua altura pode ter deslocado faixas maiores de MC para grupos diferentes, justificando a inversão dos resultados observados.

Pode-se especular ainda que os resultados apresentados de forma inversa dentro dos grupos com espessura fina ou espessa de MC podem indicar que o melhor valor de corte a ser adotado deveria ser o valor 1,5 mm, devendo ser consideradas espessuras ≤ 1,5 mm como gengiva fina. Sugere-se, dessa forma, que futuras pesquisas sejam realizadas com uma amostra maior para se avaliar se existe relação e influência da espessura da mucosa ceratinizada com a composição do fluido sulcular peri-implantar, tendo como critério de inclusão e divisão dos grupos a espessura e a largura da mucosa ceratinizada concomitantemente.

A importância da espessura de tecido ceratinizado ao redor de implantes dentários, bem como ao redor dos dentes, se dá tanto de maneira funcional como estética. Informações sobre a espessura do tecido ceratinizado e sobre o biotipo periodontal são bastante relevantes em diferentes situações clínicas, como por exemplo em casos de recessões gengivais. Indivíduos que apresentam gengiva fina tem maior chances de responder a um trauma com o desenvolvimento de recessão gengival, seja após trauma provocado por escovação inadequada ou ainda por tratamentos odontológicos, desde periodontais, ortodônticos, restauradores e

procedimentos cirúrgicos com implantes. (CLAFFEY; SHANLEY, 1986; MÜLLER; EGER, 2002; KAN et al., 2010).

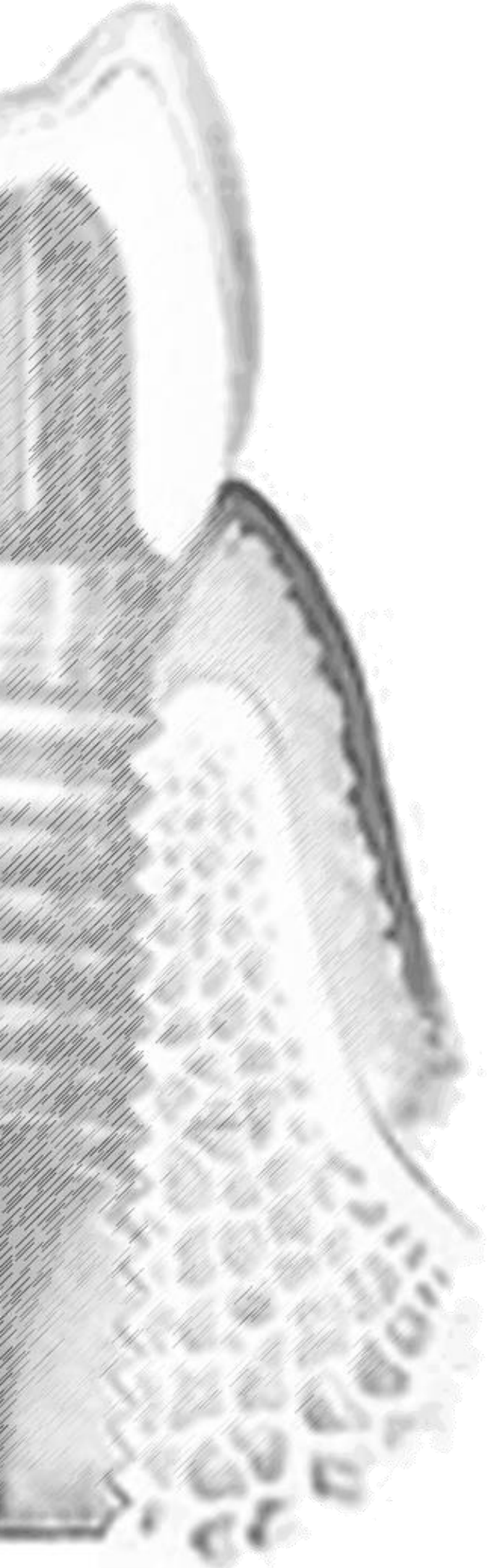
Trabalhos recentes têm especulado ou ainda relacionado a presença ou ausência de MC como um fator de risco local ao desenvolvimento de peri-implantite, como apresentado na revisão de Alani e Bishop (2014) que avaliou possíveis fatores de risco modificáveis e não modificáveis para o desenvolvimento de peri-implantite, além de propor estratégias para sua prevenção e um protocolo para manutenção de implantes. Dentre os fatores apresentados no trabalho estão incluídos a má-higiene oral, história prévia de periodontite, tabagismo, fatores genéticos, sobrecarga oclusão e reações de corpo estranho. Os fatores locais incluem a qualidade dos tecidos moles e duros peri-implantares, o prosicionamento dos implantes, o desenho da prótese e a interface implante-abutment. Os resultados de Monje et al., (2016), Poli et al. (2016), Rokn et al. (2016) e Ferreira et al. (2015) também demonstraram que a ausência de tecido ceratinizado está fortemente associada à peri-implantite. Estes fatores podem ser observados desde estudos que estabelecem as características anatômicas do tecido peri-implantar, como mencionado por Bauman et al. (1993). De acordo com o autor, no tecido-peri-implantar não há inserção de fibras de tecido conjuntivo, as quais, portanto, se orientam de forma paralela em relação à superfície do implante. Sendo assim, a principal barreira peri-implantar se dá apenas por meio dos hemidesmossomos do epitélio juncional o que torna o sítio peri-implantar mais suscetível à contaminação bacteriana, aumentando o risco de infecção e consequentemente reabsorção óssea.

Após os achados no presente estudo é possível, portanto, relacionar a quantidade de mucosa ceratinizada aos níveis de mediadores inflamatórios presentes no fluido do sulco peri-implantar. Extrapolando os resultados para a prática clínica, inferimos que sítios com faixa estreita de mucosa ceratinizada podem ter a saúde e estabilidade dos tecidos peri-implantares prejudicadas tanto a nível clínico como molecular, ressaltando a importância de uma faixa adequada mínima de mucosa ceratinizada ao redor dos implantes dentários.

Tendo em vista que técnicas terapêuticas clínicas para ganho ou aumento da faixa de mucosa ceratinizada são interessantes para pacientes com deficiência nas condições ideais dos tecidos moles peri-implantares, a partir dos achados do presente trabalho sugere-se que novas pesquisas clínicas sejam realizadas, porém

com caráter intervencional, a fim de estabelecer as melhores opções de tratamento para auxiliar e/ou garantir a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares.

Além disso seria interessante a realização de outros estudos com a análise de um maior número de parâmetros clínicos e moleculares, como outros mediadores conhecidamente anti-inflamatórios (por exemplo IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN-β, IFN-γ) que possam comprovar os achados do presente trabalho e de demais trabalhos da literatura e enfatizar mais uma vez a importância da mucosa ceratinizada. Sugerimos a realização de estudos com mais períodos de avaliação para que seja possível desenhar um perfil dos níveis das citocinas estudadas no decorrer do tempo.



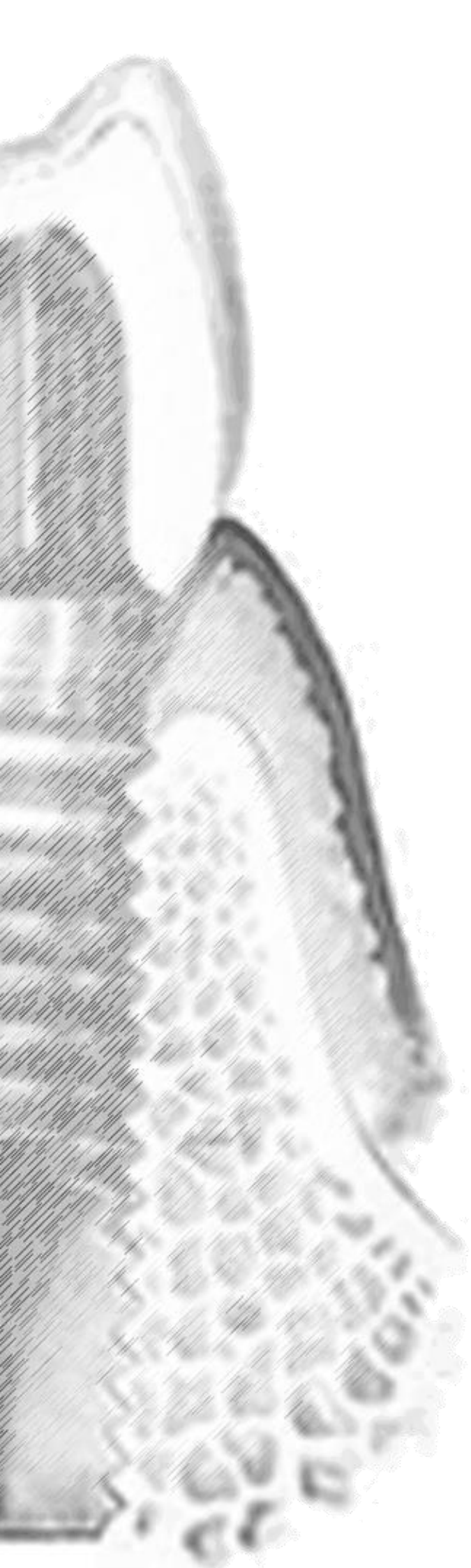
Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando as limitações metodológicas inerentes a quaisquer pesquisas, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas nos níveis de mediadores inflamatórios no fluido peri-implantar humano entre sítios com faixa de mucosa ceratinizada menor ou a igual a 2 mm e maior que 2 mm, foi possível observar a diferença de reatividade entre os grupos após o preparo inicial, levando-nos a concluir a partir do presente estudo que uma faixa maior de mucosa ceratinizada influencia os níveis dos mediadores inflamatórios IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, MIP-1α, TNF-α e VEGF presentes no fluido do sulco peri-implantar humano.

No presente estudo, não houve associação entre largura adequada (> 2 mm) ou não (≤ 2mm) da faixa de mucosa ceratinizada ao redor de implantes e parâmetros clínicos de saúde peri-implantar. Porém as diferenças clínicas apresentadas, mesmo que não estatisticamente significativas, na maioria dos parâmetros avaliados tenderam a evidenciar a importância da MC principalmente após o preparo básico periodontal.

Não houve associação entre a espessura da MC e os parâmetros clínicos ou os mediadores inflamatórios avaliados. Porém após o preparo inicial, foi possível observar diferença estatística significativa intra-grupo para os mediadores inflamatórios estudados. Tal diferença apresentada ora no grupo espesso ora no grupo fino quando se adotam diferentes valores de corte (1 mm ou 1,5 mm respectivamente), demonstra resultados inconclusivos para tal avaliação, ressaltando a importância de novas pesquisas que possam responder a esta questão.



Referências

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. São Paulo: Elsevier, 8ed. 2015, 552p.

Adibrad M, Shahabuei M, Sahabi M. Significance of the width of keratinized mucosa on the health status of the supporting tissue around implants supporting overdentures. J Oral Implantol. 2009;35(5):232-7.

Agis H, Watzek G, Gruber R. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor by periodontal fibroblasts. J Periodontal Res. 2012 Apr;47(2):165-73.

Ainamo A, Ainamo J. The width of attached gingiva on supraerupted teeth. J Periodontol Res. 1978 May; 13(3):194-8.

Ainamo A, Ainamo J, Poikkeus R. Continuous widening of the band of attached gingiva from 23 to 65 years of age. J Periodontal Res. 1981 Nov;16(6):595-9.

Ainamo J, Löe H. Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. J Periodontol. 1966 Jan-Feb;37(1):5-13.

Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. J Periodontal Res. 1976 Jul;11(4):182-8.

Alani A, Bishop K. Peri-implantitis. Part 2: Prevention and maintenance of peri-implant health. Br Dent J. 2014 Sep;217(6):289-97.

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(1):11-25.

Albrektsson T, Isidor F. Concensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the 1st european workshop on periodontology. London: Quintessence Publishing; 1994. p. 365–9.

Alfano MC. The origin of gingival fluid. J Theor Biol.1974 Sep; 47(1):127-36.

Alfano MC et al. Passively generated increase in gingival crevicular fluid flow from human gingiva. J Dent Res. 1976 Nov-Dec; 55(6):1132.

AlRowis R, AlMoharib HS, AlMubarak A, Bhaskardoss J, Preethanath RS, Anil S. Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease – Part 2. Gingival Crevicular Fluid. Journal of International Oral Health : JIOH. 2014;6(5):126-135.

Al-Sawai AA, Labib H. Success of immediate loading implants compared to conventionally-loaded implants: a literature review. J Investig Clin Dent. 2016 Aug;7(3):217-24.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY - ACADEMY REPORTS - Informational Paper: The Pathogenesis of Periodontal Diseases. J Periodont 1999 Apr;70(4):457-70.

Anderegg CR, Metzler DG, Nicoli BK. Gingiva thickness in guided tissue regeneration and associated recession at facial furcation defects. J Periodontol. 1995 May;66(5):397-402.

Ariaudo AA, Tyrvell HA. Repositioning and increasing the zone of attached gingiva. J Periodontol. 1957 Apr;28(2).106-10.

Ataoglu H, Alptekin NO, Haliloglu S, Gursel M, Ataoglu T, Serpek B, Durmus E. Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. Clin Oral Implants Res. 2002 Oct;13(5):470-6.

Ayub EA. Estudo de dois sistemas de reabilitação com implantes submetidos à ativação imediata: análise clínica, radiográfica e da estabilidade, por frequência de ressonância, SP [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Rev Bras Cienc Farm. 2005 Jan-Mar;41(1):27-51.

Baldi C, Pini-Prato G, Pagliaro U, Nieri M, Saletta D, Muzzi L, Cortellini P. Coronally advanced flap procedure for root coverage. Is flap thickness a relevant predictor to achieve root coverage? A 19-case series. J Periodontol. 1999 Sep;70(9):1077-84.

Bassetti RG, Stähli A, Bassetti MA, Sculean A. Soft tissue augmentation procedures at second-stage surgery: a systematic review. Clin Oral Investig. 2016a Sep;20(7):1369-87.

Bassetti RG, Stähli A, Bassetti MA, Sculean A. Soft tissue augmentation around osseointegrated and uncovered dental implants: a systematic review. Clin Oral Investig. 2016b Nov 21. [Epub ahead of print]

Bastos AS, Graves DT, Loureiro AP, Rossa Júnior C, Abdalla DS, Faulin Tdo E, Olsen Câmara N, Andriankaja OM, Orrico SR. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(8):E1353-62

Bauman GR, Rapley JW, Hallmon WW, Mills M. The peri-implant sulcus. Int J Oral Maxillofac Implants. 1993;8(3):273-80.

Bhatia G, Kumar A, Khatri M, Bansal M, Saxena S. Assessment of the width of attached gingiva using different methods in various age groups: A clinical study. J Indian Soc Periodontol. 2015 Mar-Apr;19(2):199-202.

Block MS, Kent JN. Factors associated with soft- and hard-tissue compromise of endosseous implants. J Oral Maxillofac Surg. 1990 Nov;48(11):1153-60.

Bouri A Jr, Bissada N, Al-Zahrani MS, Faddoul F, Nouneh I. Width of Keratinized Gingiva and the health status of the Supporting Tissues Around Dental Implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 2008 Mar-Apr;23(2):323-6.

Bowers, G. A study of the width of attached gingiva. Journal of Periodontology. 1963 May: 34(3), 201-209.

Boynuegri D, Nemli SK, Kasko YA. Significance of keratinized mucosa around dental implants: a prospective comparative study. Clin Oral Implants Res. 2013 Aug; 24(8):928-33.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I Experimental studies. Scand J Plast Reconst Surg. 1969; 2:81-100.

Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Tissue-integrated prostheses; osseointegration in clinical dentistry. Chicago: Quintessence, 1985.

Brill N, Krasse BO. The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. Acta Odontol Scand. 1958; 16(3):233-45.

Brill N. Effect of Chewing on flow of tissue fluid into human gingival pockets, Acta Odont. Scand. 1959; 17(3): 277-84.

Brito C, Tenenbaum HC, Wong BK, Schmitt C, Nogueira-Filho G.
Is keratinized mucosa indispensable to maintain peri-implant health?
A systematic review of the literature. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 Apr;102(3):643-50.

Buyukozdemir Askin S, Berker E, Akincibay H, Uysal S, Erman B, Tezcan I, Karabulut E. Necessity of keratinized tissues for dental implants: a clinical, immunological, and radiographic study. Clin Implant Dent Relat Res 2015 Feb;17(1):1-12.

Calderín S, García-Núñez JA, Gómez C. Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planing complemented by simple or repeated laser phototherapy in chronic periodontitis. Lasers Med Sci. 2013 Jan;28(1):157-66.

Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. Periodontol 2000. 2003;31:167-80.

Chiu YW, Lee SY, Lin YC, Lai YL. Significance of the width of keratinized mucosa on peri-implant health. J Chin Med Assoc. 2015 Jul;78(7):389-94.

Chung DM, Oh TJ, Shotwell JL, Misch CE, Wang HL. Significance of keratinized mucosa in maintenance of dental implants with different surfaces. J Periodontol. 2006 Aug;77(8):1410-20.

Claffey N, Shanley D. Relationship of gingival thickness and bleeding to loss of probing attachment in shallow sites following nonsurgical periodontal therapy. J Clin Periodontol. 1986 Aug;13(7):654-7.

Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: na evidence-based perspective of scaling and root planning. J Clin Periodontol. 2002 May;29(Suppl 2):6-16.

Consensus report. Mucogengival therapy. Ann Periodontol. 1996; 1(1):702-06.
Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. Periodontol 2000. 2003;31:55-76.

Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press; 2009.

Cox JF, Zarb GA. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report. Int J Oral Maxillofac Implants. 1987;2(2):91-100.

Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000. 2002;30:70-8.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000. 1997;14(1):12-32.

Dorfman HS, Kennedy JE, Bird WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival autografts. J Clin Periodontol. 1980;7:316-324.

Eger T, Müller HP, Heinecke A. Ultrassonic determination of gingival thickness. Subject variation and influence of tooth type and clinical features. J Clin Periodontol. 1996 Sep;23(9):839-45.

Egli U, Vollmer WH, Rateitschak KH. Follow-up studies of free gingival grafts. J Clin Periodontol. 1975 Apr;2(2):98-104.

Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. J Periodontol. 2004 Sep;75(9):1203-8.

Ericsson I, Lindhe J. Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog. J Clin Periodontol. 1984 Feb; 11(2):95-103.

Ferreira CF, Buttendorf AR, de Souza JG, Dalago H, Guenther SF, Bianchini MA. Prevalence of Peri-implant Diseases: Analyses of Associated Factors. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2015 Dec; 23(4):199-206.

Friedman N. Mucogingival surgery: the apically repositioned flap. J Periodontol. 1962;33(4):328-40.

Genco RJ. Diagnóstico, prognóstico e plano de tratamento periodontal. In: Genco RJ, Cohen DW, Goldman HM. Periodontia contemporânea. 2ª ed. São Paulo: Santos; 1997. p. 348-59.

Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid level. J Clin Periodontol. 2003 Feb;30(2):145-153.

Gmmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostagrandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000, 1997 Jun;14:112-43

Goaslind GD, Robertson PB, Mahan CJ, Morrison WW, Olson JV. Thickness of facial gingiva. J Periodontol. 1977 Dec;48(12):768-71.

Gonzalez MKS. Avaliação longitudinal, clínica e radiográfica, do processo de reparo dos tecidos periodontais marginais após cirurgia ressectiva de aumento de coroa [tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2006.

Graham GJ, Locati m. Regulation of the imune and inflammatory responses by the ‘atypical’ chemokine receptor D6. J Pathol. 2013;229(2):168-75.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2003 Mar;74(3):391-401.

Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. Front Biosci. 2008;13(1):1227-39.

Greer A, Zenobia C, Darveau RP. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. Periodontol 2000. 2013 Oct;63(1):67-79.

Gupta G. Gingival crevicular fluid as a periodontal diagnostic indicator- I: Host derived enzymes and tissue breakdown products. Journal of Medicine and Life. 2012;5(4):390-397.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. Biochem J. 1990;265(3):621-36.

Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):292-304.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S.Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone. 1999 Sep;25(3):255-9.

Huang D, Wang HL. Flap thickness as a predictor of root coverage: A systematic review. J Periodontol. 2006 Oct;77(10)1625-34.

Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. Rev Med (São Paulo). 2010 Jul-Dec;89(3/4):125-31.

Kan JY, Morimoto T, Rungcharassaeng K, Roe P, Smith DH. Gingival biotype assessment in the esthetic zone: visual versus direct measurement. Int J Periodontics Restorative Dent. 2010 Jun;30(3):237-43.

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 Nov-Dec;10(6):696-701.

Kao RT, Fagan MC, Conte GJ. Thick vs. Thin gingival biotypes: a key determinant in treatment planning for dental implants. J Calif Dent Assoc. 2008 Mar;36(3):193-8

Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Hämmerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. Clin Oral Implants Res. 2003;14(3):329-39.

Kim BS, Kim YK, Yun PY, Yi YJ, Lee HJ, Kim SG, Son JS. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Mar;107(3):e24-8.

Kisch J, Badersten A, Egelberg J. Longitudinal observation of “unattached,” mobile gingival areas. J Clin Periodontol. 1986 Feb; 13(2);131-4.

Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. Int J Periodontics Restorative Dent. 2006 Apr;26(2):135-41.

Kushner I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. Cytokine Growth Factor Rev. 1998 Sep-Dec;9(3-4):191-6
Lagos MLEP. Participação da mastigação e da gengiva ceratinizada na fisiologia do sulco gengival, SP [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2003.

Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. Dev Comp Immunol. 2004;28(5):443-60.

Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1098:216-29.

Lang NP, Löe H. The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health. J Periodontol. 1972; 43:623-27.

Lin GH, Chan HL, Wang HL. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review. J Periodontol. 2013 Dec;84(12):1755-67.

Lindhe J, Hamp SE, Löe H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. J Periodontal Res. 1975;10(5):243-55.

Lindhe J, Nyman S. Alterations of the position of the marginal soft tissue following periodontal surgery. J Clin Periodontol. 1980 Dec; 7(6):525-30.

Lindhe J, Nyman S. Exames em pacientes com doença periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 1999. p. 271-80.

Linkevicius T, Apse P, Grybauskas S, Puisys A. The influence of soft tissue thickness on crestal bone changes around implants: a 1-year prospective controlled clinical trial. Int J Oral Maxillofac Implants. 2009 Jul-Aug;24(4):712-9.

Löe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence and extent of gingival recession. J Periodontol. 1992 Jun;63(6):489-95.

Loe H. Physiological aspects of the gingival pocket. An experimental study. Acta Odontol Scand. 1961 Dec; 19:387-95.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965;36:177-87.

Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? Periodontol 2000. 2005;39:53-72.

Macphee T, Cowley G. The environment of the tooth. In: Essentials of periodontology an periodontics. Oxford: London – Edinburg Melbourne, Blackwell scientific publications, 1995, p.17-27

Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. Ann Periodontol. 1999;4(1):7-19.

Marquez IC. The role of keratinized tissue and attached gingiva in maintaining periodontal/peri-implant health. Gen Dent. 2004;52(1):74-8.

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingival by combined *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Immunology. 1992;76(1):42-7.

Maynard JG Jr, Wilson RD. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. J Periodontol. 1979 Apr;50(4):170-4.

Mazeland GR. The mucogingival complex in relation to alveolar process height and lower anterior face height. J Periodontal Res. 1980 Jul;15(4):345-52.

Mendonça JAG. Avaliação e análise das distâncias biológicas do periodonto mediante nova metodologia, SP [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2001.

Mombelli A, van Oosten mA, Schurch E, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987;2(4):145-51.

Mombelli A, Lang NP. Clinical parameters for the evaluation of dental implants. Periodontol 2000. 1994;4:81-6.

Monje A, Galindo-Moreno P, Tözüm TF, Suárez-López del Amo F, Wang HL. Into the Paradigm of Local Factors as Contributors for Peri-implant Disease: Short Communication. Int J Oral Maxillofac Implants. 2016 Mar-Apr;31(2):288-92.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF-β, interleukin (IL)-8 and IL-10. Braz Oral Res. 2011 Mar-Apr;25(2):157-62.

Morandini ACF, Sipert CR, Gasparoto TH, Greghi SLA, Passanezi E, Resende MLR, Sant'ana AP, Campanelli AP, Garlet GP, Santos CF. Differential production of macrophage inflammatory protein 1-α, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolyssaccharide from P. gingivalis. J Periodontol. 2010; 81(2): 310-17.

Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015 Mar;44(3):377-88.

Müller HP, Eger T. Masticatory mucosa and periodontal phenotype: a review. Int J Periodontics Restorative Dent. 2002 Apr;22(2):172-83.

Müller HP, Eger T. Gingival phenotypes in young male adults. J Clin Periodontol. 1997 Jan;24(1):65-71.

Müller HP, Heinecke A. The influence of gingival dimensions on bleeding upon probing in young adults with plaque-induced gingivitis. Clin Oral Incestig. 2002 Jun;6(2):69-74.

Müller HP, Stahl M, Eger T. Dynamics of mucosal dimensions after root coverage with a bioresorbable membrane. J Clin Periodontol. 2000 Jan;27(1):1-8.

Murata M, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, Takeda H, Araki H, Shin K, Okuda K, Miyata T, Yoshie H. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2002 Dec;13(6):637-43.

Nabers CL. Repositioning the attached gingiva. J Periodontol. 1954 Jan;25(1):38-9.

Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z. Interproximal papillae reconstruction in maxillary implants. J Periodontol. 2000 Feb; 71(2):308-14.

Nishi H, Ohta K, Takechi M, Yoneda S, Hiraoka M, Kamata N. Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. Oral Dis. 2010 Jul;16(5):438-44.

Nogueira-Filho G, Pesun I, Ploegman C, Wijegunasinghe M, McCulloch CA. Longitudinal Comparison of Cytokines in Peri-Implant Fluid and Gingival Crevicular Fluid in Healthy Mouths. J Periodontol. 2014 Nov;85(11):1582-8.

Offenbacher S, Salvi GE. Induction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. Clin Infect Dis. 1999;28(3):505-13.

Oliveira APL, Faveri M, Gursky LC, Mestnik MJ, Feres M, Haffajee AD, Socransky SS, Teles RP. Effects of periodontal therapy on GCF cytokines in generalized aggressive periodontitis subjects. J Clin Periodontol. 2012;39(3):295–02.

Olsson M, Lindhe J. Periodontal characteristics in individuals with varying form of the upper central incisors. J Clin Periodontol. 1991 Jan;18(1):78-82.

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 Nov-Dec;11(6):794-9.

Pashley DH. A mechanistic analysis of gingival fluid production. J Periodontol Res. 1976 Apr; 11(2):121-34.

Plessas A. Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence. Oral Health Dent Manag. 2014 Mar;13(1):71-80.

Poli PP, Beretta M, Grossi GB, Maiorana C. Risk indicators related to peri-implant disease: an observational retrospective cohort study. J Periodontal Implant Sci. 2016 Aug;46(4):266-76.

Pradeep AR, Roopa Y, Swati PP. Interleukin-4, a T-helper 2 cell cytokine, is associated with the remission of periodontal disease. J Periodontal Res. 2008;43(6):712-6.

Pranskunas M, Poskevicius L, Juodzbalys G, Kubilius R, Jimbo R. Influence of Peri-Implant Soft Tissue Condition and Plaque Accumulation on Peri-Implantitis: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2016 Sep 9:7(3):e2.

Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. J Pharm Biomed Anal. 2005; 36: 1037-44.

Recker EN, Avila-Ortiz G, Fischer CL, et al. A Cross-sectional Assessment of Biomarker Levels around Implants Versus Natural Teeth in Periodontal Maintenance Patients. Journal of periodontology. 2015;86(2):264-272.

Reinhardt RA, Masada MP, Johnson GK, DuBois LM, Seymour GJ, Allison AC. IL-1 in gingival crevicular fluid following closed root planing and papillary flap debridement. J Clin Periodontol. 1993 Aug;20(7):514-9.

Resende DRB. Avaliação comparativa clínica e histológica de enxertos gengivais livres autógenos e de matriz dérmica acelular alógena na criação e manutenção de uma faixa de mucosa ceratinizada em humanos, SP [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2004.

Rokn A, Aslroosta H, Akbari S, Najafi H, Zayeri F, Hashemi K. Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. Clin Oral Implants Res. 2016 Feb 26. [Epub ahead of print]

Rose ST, App GR. A clinical study of the development of the attached gingiva along the facial aspect of the maxillary and mandibular anterior teeth in the deciduous, transitional and permanent dentitions. J Periodontol. 1973 Mar;44(3):131-39.

Rothwell NJ. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. Trends Pharmacol Sci. 1991;12(11):430-6.

Ryu OH, Choi SJ, Linares AM, Song IS, Kim YJ, Jang KT et al. Gingival epithelial cell expression of macrophage inflammatory protein-1alpha induced by interleukin-1beta and lipopolysaccharide. J Periodontol. 2007;78(8):1627-34.

Salvi GE, Lang NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19 Suppl:116-27.

Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis. J Periodontal Res. 2010; 45(2):262–70.

Schierano G, Pejrone G, Brusco P, Trombetta A, Martinasso G, Preti G, Canuto RA. TNF-alpha TGF-beta2 and IL-1beta levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. J Clin Periodontol. 2008 Jun;35(6):532-8.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000. 1997; 13:91-20.

Schrott AR, Jimenez M, Hwang JW, Fiorellini J, Weber HP. Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. Clin Oral Implants Res. 2009; 20(10):1170-7.

Seibert J, Lindhe J. Esthetics and periodontal therapy. In: Lindhe J, editor. Textbook of Clinical Periodontology, 2rd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1989. p. 477-514.

Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. Clin Oral Implants Res. 2009 Feb;20(2):169-74.

Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, Yoshie H. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay. Arch Oral Biol. 2013 Jun; 58(6):724-30.

Schroeder A, Van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. J Maxillofac Surg. 1981 Feb;9(1):15-25.

Siegel IA. Permeability of the oral mucosa. In: Meyer J, Squier CA, Gerson SJ. The structure and function of oral mucosa. Oxford: Pergamon press, 1984, p.95-108. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J. 1975;25(4):229-35.

Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. J Prosthet Dent. 1989;62(5):567-72.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984;11(1):21-32.

Sorsa T, Tervahartiala T, Stenman M, Suomalainen K, Mäntylä P. Chair-side diagnostic point-of-care MMP-tools in periodontitis and peri-implantitis. Nordic dentistry yearbook. Lyngby, Denmark; Quintessence Publishing Co. Ltd.; 2004. p. 79–95.

Sousa V, Mardas N, Farias B, Petrie A, Needleman I, Spratt D, Donos N. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. Clin Oral Implants Res. 2016 Jul;27(7):787-844.

Souza SL, Andrade PF, Silva JS, Tristão FS, Rocha FA, Palioto DB, Grisi MF, Taba M Jr, Novaes AB Jr. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor-β1 levels in the gingival crevicular fluid. Photomed Laser Surg. 2013 Feb;31(2):65-71.

Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. Oral Microbiol Immunol. 2000 Jun;15(3):172-80.

Stetler KJ, Bissada NF. Significance of the width of keratinized gingiva on the periodontal status of teeth with submarginal restorations. J Periodontol. 1987 Oct;58(10):696-700.

Stoner JE, Mazdyasna S. Gingival recession in the lower incisor region of 15-year-old subjects. J Periodontol. 1980 Feb; 51(2):74-6.

Suárez-Lopez Del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2016 Sep 9;7(3):e13.

Thunell DH, Tymkiw KD, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, Brogden KA, Guthmiller JM. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. J Periodontal Res. 2010;45(1):148-52.

Tinti C, Parma-Benfenati S. Coronally positioned palatal sliding flap. Int J Periodontics Restorative Dent. 1995 Jun;15(3):298-310.

Trey E, Bernimoulin JP. Influence of free gingival grafts on the health of the marginal gingiva. J Clin Periodontol. 1980 Oct; 7(5):381-93.

Warrer K, Buser D, Lang NP, Karring T. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. Clin Oral Implants Res. 1995 Sep;6(3):131-8.

Wennström JL. Lack of association between width of attached gingiva and development of soft tissue recession. A 5-year longitudinal study. J Clin Periodontol. 1987 Mar; 14(3):181-4.

Wennström J, Lindhe J. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. J Clin Periodontol. 1983 Mar; 10(2):206-21.

Wennström JL, Ekestubbe A, Gröndahl K, Karlsson S, Lindhe J. Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. J Clin Periodontol 2004;31:713–24.

Wennström J, Prato GPP. Terapia mucogengival. In: Linghe J, Karrigan T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 393-427.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol. 2000;27(9):648-57.

Yaghobee S, Khorsand A, Paknejad M. Comparison of Interleukin-1β Levels in Gingival Crevicular Fluid and Peri-Implant Crevicular Fluid and Its Relationship with Clinical Indexes. Journal of Dentistry (Tehran, Iran). 2013;10(1):1-9.

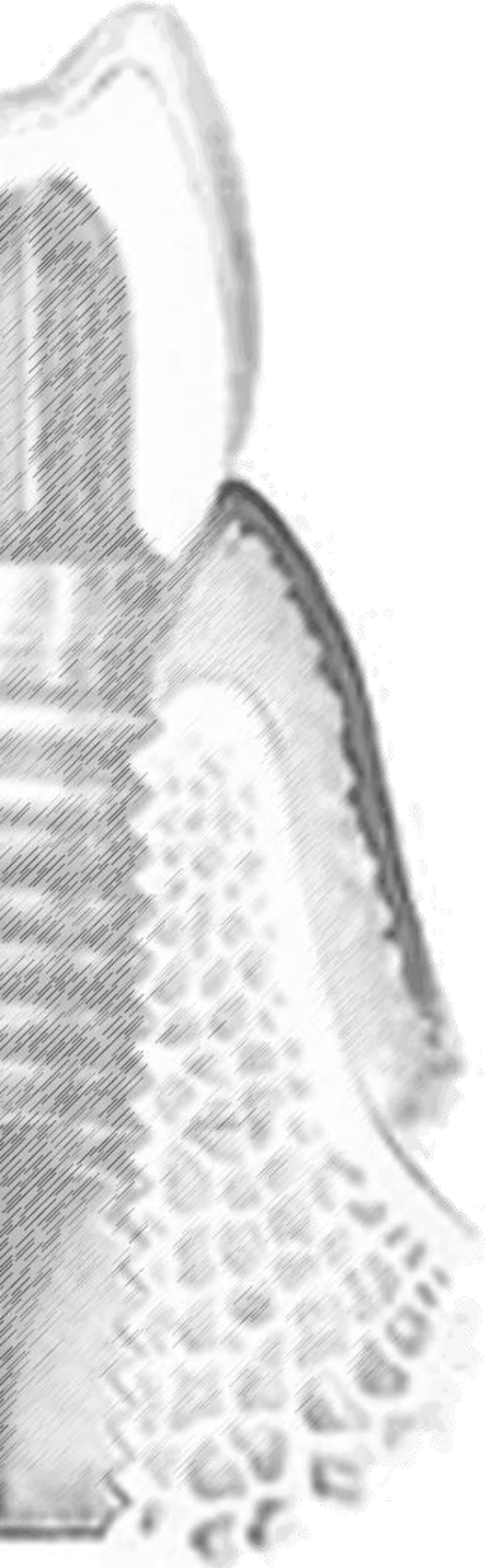
Yaghobee S, Khorsand A, Rasouli Ghohroudi AA, Sanjari K, Kadkhodazadeh M. Assessment of interleukin-1beta and interleukin-6 in the crevicular fluid around healthy implants, implants with peri-implantitis, and healthy teeth: a cross-sectional study. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2014;40(5):220-224.

Yoshinari N, Kawase H, Mitani A, Ito M, Sugiishi S, Matsuoka M, Shirozu N, Ishihara Y, Bito B, Hiraga M, Arakawa K, Noguchi T. Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA

expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. J Periodontal Res. 2004 Jun;39(3):158-67.

Zehnder M, Greenspan JS, Greenspan D, Bickel M. Chemokine gene expression in human oral mucosa. Eur J Oral Sci. 1999;107(4):231-5.

Zigdon H, Machtei EE. The dimensions of Keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. Clin Oral Implants Res. 2008 Apr;19(4):387-92.



Anexos

ANEXO I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro paciente:

Você está convidado a participar desta pesquisa, intitulada "Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários". Esta pesquisa avaliará o líquido que sai da gengiva ao redor do(s) implante(s) que já está(ão) na sua boca, utilizado(s) para substituir um ou mais dentes ausentes. Será avaliada também a qualidade da gengiva ao redor deste(s) implante(s). De acordo com esta pesquisa, na primeira consulta será feita uma radiografia do implante para verificar a saúde do osso. Se o osso estiver saudável você poderá participar da pesquisa. Se existir perda óssea no implante você será encaminhado para tratamento do implante e não poderá participar da pesquisa.

Assim, se você for escolhido para participar, você (sujeito da pesquisa) será atendido em pelo menos 5 consultas. Na primeira consulta serão realizadas medidas da gengiva e coleta do líquido que sai da gengiva ao redor do(s) implante(s) e também será realizada limpeza em todos os seus dentes e também no(s) implante(s). As outras consultas serão semanais, para avaliar sua higiene bucal, e na última consulta, 30 dias após a primeira, serão feitas as mesmas medidas da gengiva e coletado novamente o líquido ao redor do(s) implante(s). O tempo de todas as consultas dependerá da sua colaboração, mas geralmente não passará de 1h de atendimento.

A coleta do líquido será feita utilizando uma fita de papel absorvente muito pequena, que será levada para análise em laboratório. Esta coleta não causará dano algum a você, pois apenas será encostada a fita de papel entre a gengiva e seu(s) implante(s) por alguns segundos. Esse procedimento poderá apenas ser desconfortável ou cansativo, pois será repetido 6 vezes em cada implante, apesar de o material utilizado e a maneira como será realizada não causar incômodo algum (as tiras de filtro de papel absorvente utilizadas são macias e o método de realização da coleta, já explicado, não provocará nenhuma sensibilidade dolorosa ao paciente). Para realizar uma das medidas da gengiva será aplicada uma pomada anestésica, para que uma pequena agulha utilizada para medir não cause nenhuma dor. Esse procedimento é de rotina para pesquisas que estudam a gengiva dos pacientes e não apresenta risco nenhum a você. Mesmo assim, eventuais danos decorrentes dessa pesquisa serão devidamente indenizados.

Todos os procedimentos fazem parte das consultas de controle de implante e também das consultas de rotina da clínica de periodontia. O profissional que irá te atender se preocupa com cuidados em relação à esterilização dos materiais, atenção à saúde da sua boca e responsabilidade com o tratamento. Desta forma, todos os pacientes que participarem obterão como benefícios desta pesquisa o acompanhamento profissional com cuidados de higiene bucal, limpeza profissional, controle de seu(s) implante(s) e também o conhecimento da composição do líquido ao redor de seu(s) implante(s), antecipando problemas que possam afetar a saúde da gengiva ao redor deste(s) implante(s). Os custos dos procedimentos que serão realizados são de responsabilidade do profissional, através do orçamento da pesquisa, não havendo necessidade de serem pagos por você, nem havendo necessidade de ressarcimento caso haja qualquer outra despesa adicional decorrente de sua participação na pesquisa.

Para o esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre sua participação na pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável (***Dra. Andréia Pereira de Souza***) pelo endereço institucional (***Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru/SP – Departamento de Periodontia***), telefone celular ***(11) 9 9598-5463*** ou e-mail (***andreia.xlvi@usp.br***) e para denúncias e/ou reclamações entrar em contato com o CEP-FOB/USP (***Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo***) pelo endereço: ***Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, Bauru/SP – CEP 17012-901 – Prédio da Pós-Graduação (bloco E – pavimento superior)***, ou pelo telefone ***(14) 3235-8356*** de segunda à sexta-feira, no horário das **13h30 às 17 horas**, em dias úteis, ou e-mail: ***cep@fob.usp.br***.

Esclarecemos ainda que se for seu desejo você poderá retirar-se da pesquisa a qualquer momento e deixar de participar do estudo. Vale também enfatizar que manteremos o caráter confidencial das informações relacionadas com sua privacidade, e o manteremos

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: periodontia@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8366
http://www.fob.usp.br

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Prótese

constantemente atualizado quanto ao seu resultado. Lembramos que todas as informações e registros relacionados ao planejamento e/ou tratamento poderão ser utilizadas por esta Faculdade (FOB/USP), para fins de pesquisa, ensino e de divulgação em jornais e/ou revistas nacionais e internacionais, desde que seja mantido sigilo com relação à identidade do sujeito da pesquisa.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador(a) da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, **DECLARA** e **FIRMA** seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por fim, como pesquisadora responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarem de acordo assinam o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o sujeito da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de 20_____.

_____	_____
Assinatura do Participante da Pesquisa	Assinatura da Pesquisadora Responsável

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:
Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **13h30 às 17 horas**, em dias úteis.
Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75
Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901
Telefone/FAX(14)3235-8356
e-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO II - Aprovação do Comitê de Ética

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários

Pesquisador: Andréia Pereira de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 37648914.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.113.725

Data da Relatoria: 17/06/2015

Apresentação do Projeto:

Para o desenvolvimento do Projeto "Análise clínica e de marcadores biológicos no fluido do sulco peri-implantar correlacionando-os à mucosa ceratinizada ao redor de implantes dentários" serão selecionados 50 implantes unitários, dos quais 25 deverão ter uma faixa estreita de mucosa ceratinizada até 2 mm (grupo 1) e os outros 25 selecionados deverão ter uma faixa de mucosa ceratinizada maior ou igual a 3 mm (grupo 2), de pacientes parcialmente desdentados, voluntários e previamente reabilitados com prótese sobre implante, das clínicas das Disciplinas de Periodontia e Clínica Integrada Reabilitadora dos Cursos de Graduação e Pós-graduação da FOB/USP. Os pacientes serão submetidos inicialmente ao exame clínico, ou seja, anamnese e exame físico, incluindo exame periodontal e exame radiográfico (para confirmação do diagnóstico clínico). Os pacientes deverão ter: idade entre 20 e 40 anos, implantes dentários unitários e prótese sobre implante em função há pelo menos 6 meses, ausência de periodontite e/ou peri-implantite e capacidade de controle de placa adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar clinicamente os tecidos peri-implantares e analisar comparativamente os níveis de mediadores inflamatórios (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-, MIP-1 e VEGF) presentes no fluido do sulco peri-implantar humano de acordo com a faixa de mucosa ceratinizada presente, através de ensaio

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

imunoenzimático (ELISA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos decorrem de, durante a avaliação clínica, um dos parâmetros ser a espessura da mucosa ceratinizada, o qual poderá ocasionar desconforto e sensibilidade dolorosa mínima ao paciente (o procedimento será realizado sob anestesia local tópica). Adicionalmente, o procedimento de coleta das amostras poderá ser desconfortável ou cansativo para o paciente, pois será repetido 6 vezes em cada sítio, apesar de o material utilizado e a maneira como será realizada não causar incômodo ou sensibilidade dolorosa ao paciente. Os benefícios desta pesquisa ao participante consistem no acompanhamento profissional com cuidados de higiene e controle de seu(s) implante(s) e também o conhecimento dos marcadores biológicos do fluido do sulco peri-implantar, antecipando problemas que possam afetar a saúde dos tecidos peri-implantares. Além disso, como resultado do estudo, será conhecida a relação entre a quantidade de mucosa ceratinizada e os mediadores analisados, se houver, contribuindo para justificativa de sua importância para um adequado estado de saúde peri-implantar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa não apresenta riscos físicos aos participantes além daqueles previstos nos procedimentos dessa natureza. Os documentos estão em ordem. Havia sido apontado no parecer anterior que os riscos não estavam esclarecidos, a pesquisadora esclareceu os riscos no projeto mas faltou fazer o mesmo no TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As correções solicitadas por este CEP foram respondidas adequadamente pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 17.06.2015, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Continuação do Parecer: 1.113.725

e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

BAURU, 18 de Junho de 2015

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

ANEXO III - Tabela descritiva com o cálculo do erro casual de Dahlberg e cálculo do erro sistemático pelo teste "t" pareado. Parâmetros avaliados: profundidade de sondagem mésio-vestibular (PSM), profundidade de sondagem no centro da face vestibular (PSC), profundidade de sondagem disto-vestibular (PSD), largura da mucosa ceratinizada mésio-vestibular (LMCMV), largura da mucosa ceratinizada no centro da face vestibular (LMCC), largura da mucosa ceratinizada disto-vestibular (LMCDV), espessura da mucosa ceratinizada (EMC).

					ERRO SISTEMÁTICO		***ERRO CASUAL***
MEDIDA	1ª Medição		2ª Medição		T	P	Erro
	Média	DP	Média	DP			
PSM	3,15	0,93	3,15	0,93	0,000	1,000	0,22
PSC	2,90	1,17	2,85	1,18	0,567	0,577	0,19
PSD	3,45	1,28	3,40	1,31	0,326	0,748	0,34
LMCMV	2,85	1,79	2,90	1,80	1,000	0,330	0,11
LMCC	2,60	1,88	2,55	1,88	1,000	0,330	0,11
LMCDV	3,05	1,99	3,10	2,00	1,000	0,330	0,11
EMC	1,32	0,41	1,37	0,45	0,799	0,434	0,15