



CEPPE

Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

GUSTAVO PEREIRA MARDEGAN

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
TGF- β , IL-17 E IL-23 EM TECIDOS PERI-IMPLANTARES DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM PERI-IMPLANTITE**

Guarulhos

2014

GUSTAVO PEREIRA MARDEGAN

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE
TGF- β , IL-17 E IL-23 EM TECIDOS PERI-IMPLANTARES DE
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM PERI-IMPLANTITE**

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de
Mestre em Odontologia
Área de Concentração: Implantodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos

Co- Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Guarulhos

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

M322a

Mardegan, Gustavo Pereira

Avaliação dos níveis de expressão gênica de TGF- β , IL-17 e IL-23 em tecidos peri-implantares de indivíduos saudáveis e com peri-implantite / Gustavo Pereira Mardegan – 2014.

39 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Ferreira Bastos

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós- Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2014.

1. Peri-implantite. 2. Citocinas. 3. Expressão gênica. I. Título. II. Bastos, Marta Ferreira (Orientadora). III. Universidade Guarulhos.

CDD. 617.6



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DE TGF- β , IL-17 E IL-23 EM TECIDOS PERI-IMPLANTARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E COM PERI-IMPLANTITE" em sessão pública realizada em 28 de Março de 2014, considerou o candidato GUSTAVO PEREIRA MARDEGAN aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) *Marta Ferreira Bastos*

2. Profa. Dra. Susana D'Avila (ADOCI) *Susana D'Avila*

3. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG) *Leandro Chambrone*

Guarulhos, 28 de Março de 2014.

“ A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

(Platão)

Aos meus pais, Valdir e Lucília, por todo amor, carinho, dedicação na formação de meu caráter, e por terem me dado a educação que levo e levarei comigo durante toda minha vida. Dedico este trabalho à eles...

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por sempre iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais, por todo o esforço e dedicação para que eu conseguisse chegar nesse momento.

Ao meu irmão, Gabriel, que apesar das discussões, cresceu ao meu lado, sendo sempre muito importante na minha vida.

Aos meus avós, Eujácio, Lourdes, Ilídio e Ana, pelo carinho e amor, e por me mostrarem o valor da sabedoria.

Aos meus amigos, pela amizade fraterna e sincera que carregamos, sendo essenciais em minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marta F. Bastos, por fazer esse trabalho acontecer. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência e pela formação que adquiri sob sua orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, pela confiança e pelo suporte me dado em todo o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Faveri, pelo material cedido para esta pesquisa. Muito obrigado.

Aos meus amigos de mestrado, obrigado pela ajuda, conselhos e convivência. Foi uma relação muito agradável.

Ao amigo de mestrado Leandro, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Mestrado em Odontologia: Prof. Dr. Leandro Chambrone, Prof^a. Dr^a. Alessandra Cassoni Ferreira, Prof^a. Dr^a. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof^a. Dr^a. Magda Feres, Prof. Dr. José Augusto, Poliana Duarte, Prof. Dr. André Figueiredo.

À ex-aluna de mestrado da UnG, Luciana Aparecida de Gouveia Cardoso, pelo enorme trabalho de triagem dos pacientes utilizados nessa pesquisa.

Aos pacientes, pois sem eles esta pesquisa não teria acontecido.

RESUMO

Os implantes dentários tornaram-se uma alternativa terapêutica para pacientes parcial ou totalmente edêntulos. O sucesso do tratamento baseia-se no processo de osteointegração, no qual o implante passa a ser suportado pelo tecido ósseo recém-formado na ausência de tecido fibroso. As falhas tardias dos implantes dentários são responsáveis pela maioria dos casos de perda do implante e frequentemente associadas às infecções bacterianas, como a periimplantite. É importante destacar que, com maior número de implantes dentários instalados nas últimas décadas, e com o fato da periimplantite ser uma doença infecto-inflamatória, o desenvolvimento de novos estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos imuno-inflamatórios envolvidos no patogênese de periimplantite são necessários. A ativação da resposta imune adaptativa foi originalmente descrita como mediada por duas subpopulações efetoras de células T CD4+: T auxiliares 1 (Th1) e Th2. Este paradigma foi modificado recentemente após a caracterização de células Th17 e Treg, responsáveis pela produção da IL-17/IL-23 e TGF- β , respectivamente. Embora o envolvimento destas subpopulações de células T CD4+ tenham sido analisadas na periodontite crônica, um pequeno número de estudos avaliou a expressão das citocinas IL-23, IL-17 e TGF- β na peri-implantite. Portanto, o objetivo do presente estudo avaliar os níveis de expressão gênica de IL-17, IL-23, e TGF- β em tecidos peri-implantares saudáveis e com periimplantite. Quarenta indivíduos (20 saudáveis e 20 com peri-implantite) foram incluídos neste estudo seguindo os critérios de inclusão e exclusão (ser parcial ou totalmente edentulo com pelo menos um implante instalado, não-fumante, não-grávida ou lactante e deveriam ser sistêmica e periodontalmente saudáveis, sem uso de antibióticos ou anti-inflamatórios nos últimos seis meses). Além disso, os indivíduos com peri-implantite deveriam apresentar perda do nível clínico de inserção, aumento da profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e perda óssea radiográfica ≥ 3 mm. Biópsias de tecidos peri-implantar foram coletadas para análise dos níveis de expressão do mRNA da IL-23, IL-17 e TGF- β . As amostras foram submetidas à extração do RNA total, tratamento com DNase e síntese de cDNA. Subsequentemente, a reação de PCR em tempo real foi realizada para avaliar os níveis de expressão gênica que foram analisados por métodos estatísticos. Maiores níveis do mRNA do TGF- β foram observados em biópsias do grupo controle saudável, enquanto os níveis de RNAm da IL-23 estavam significativamente aumentados no grupo com periimplantite ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças nos níveis de expressão do mRNA da IL-17 entre os grupos. Em conclusão, é possível sugerir que houve predomínio do perfil de resposta Th17 sobre o Treg na peri-implantite, com base nos maiores níveis de IL-23 e menores de TGF- β detectados.

Palavras-chave: peri-implantite, citocinas, IL-17; IL-23; TGF- β ; expressão gênica; RT-PCR.

ABSTRACT

Dental implants had become an alternative therapy for partial or total edentulous patients. The success of this treatment is based on the osteointegration process, in which the implant starts to be supported by the newly-formed bone tissue in the absence of fibrous tissue. The late failures of dental implants are responsible by the majority of cases of implant loss and frequently associated to bacterial infections, as the peri-implantitis. It is important to stand that with increased number of dental implants installed in the last decades, and with the fact of peri-implantitis to be infectious-inflammatory diseases, the development of novel studies to better comprehension of the immune-inflammatory mechanisms involved in the pathogenesis of peri-implantitis are necessary. Activation of the adaptive immune response was originally described as mediated by 2 subpopulations of effector CD4+ T cells: T helper 1 (Th1) and Th2. This paradigm was modified recently following the characterization of Th17 and Treg cells, responsible by production of the IL-17/IL-23 and TGF- β , respectively. Although the involvement of these CD4+ helper T subpopulations have been analyzed in chronic periodontitis, a few number of the studies evaluated the expression of cytokines IL-23, IL-17 and TGF- β , in peri-implantitis. Therefore, the present study characterized the gene expression levels of IL-17, IL-23, and TGF- β in healthy and with peri-implantitis tissues. Forty subjects (20 healthy and 20 peri-implantitis) were enrolled in this study following the inclusion and exclusion criteria (to be partial or total edentulous with at least one implant installed, non-smoking, non-pregnant or lactant and they must be systemic and periodontally healthy, no use of antibiotics or anti-inflammatory drugs in last six months). Furthermore, the subjects with peri-implantitis must present loss of clinical attachment level, increase of probing depth, bleeding on probing, and radiographic bone loss ≥ 3 mm. Peri-implantar tissue biopsies were sampled for analysis of the mRNA expression levels for IL-23, IL-17 and TGF- β . The samples were submitted to total RNA extraction, DNase treatment and cDNA synthesis. Subsequently, the Real time PCR reaction was performed and the gene expression levels was analysed by statistical methods. Higher levels of TGF- β mRNA were observed in biopsies from healthy control while the IL-23 mRNA levels were significantly increased in the peri-implantitis group ($p < 0.05$). No differences in IL-17 mRNA levels were detected between groups. In conclusion, it is possible to suggest that in peri-implantitis there was a predominance Th17 regarding Treg profile response based on the higher levels of IL-23 and lower levels of TGF- β detected.

Keywords: peri-implantitis; cytokines; IL-17; IL-23; TGF- β ; gene expression; RT-PCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Implantes dentários	9
1.2	Aspectos microbiológicos envolvidos na peri-implantite	10
1.3	Aspectos imunológicos do processo inflamatório	11
1.4	Envolvimento da resposta inflamatória com a perda óssea	13
2	PROPOSIÇÃO	16
3	ARTIGO CIENTÍFICO	17
4	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
	ANEXO	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Implantes dentários

Os implantes dentários tornaram-se uma alternativa para a terapia de pacientes com perda de elemento dentário ou edêntulos totais. O sucesso desta terapia, baseia-se no processo de osseointegração, no qual o implante passa a ser suportado pelo tecido ósseo neoformado sem envolvimento do tecido fibroso na sustentação do mesmo (Schwarz; Becker, 2007; Renvert et al., 2012).

Embora excelentes resultados da terapia implantar tenham sido mostrados na literatura científica, algumas complicações são relatadas e podem ser definidas como precoces ou tardias (Cardoso, 2012). Dentre as precoces podem ser citadas: o planejamento inapropriado, procedimentos cirúrgicos e protéticos inadequados, falhas no material e na manutenção (American Academy of Periodontology, 2013). As falhas tardias que geram a perda de implantes são as mais comumente relatadas e associadas às infecções bacterianas, como a peri-implantite (Renvert et al., 2012).

A doença peri-implantar pode ser definida como uma lesão inflamatória no tecido peri-implantar que circunda o implante, e de acordo com os tecidos comprometidos pode ser dividida em: mucosite e peri-implantite. A mucosite peri-implantar é uma lesão inflamatória que limita-se à mucosa, enquanto a peri-implantite, além de afetar mucosa, compromete o tecido ósseo de suporte (Renvert; Persson, 2009). A incidência de peri-implantite em nível mundial é de 31,2% (Costa et al., 2012).

A perda progressiva de osso marginal é sinônimo de falha no tratamento com implantes, sem o diagnóstico e a terapia correta pode-se ter a falha completa na intervenção implantar e conseqüentemente, a perda do implante (Charalampakis et al., 2011). Os sinais clínicos da progressão da peri-implantite são a perda do osso alveolar e a formação de bolsas peri-implantares cada vez mais profundas, com perda de nível clínico de inserção e aumento da profundidade de sondagem (Renvert et al., 2012).

O início e progressão das infecções peri-implantares é determinado pelo acúmulo de biofilme bacteriano. Porém, outros fatores podem ter uma influência negativa e favorecer o progresso da doença (Schwarz; Becker, 2007). Os fatores que podem contribuir para o insucesso dos implantes são: histórico de doenças periodontais; tabagismo e doenças sistêmicas, como o diabetes. Outros fatores também tem sido colocados na literatura como prováveis indicadores de risco, como: o consumo de álcool; fatores genéticos como o polimorfismo para IL-1; textura da superfície do implante; sobrecarga oclusal; condições da mucosa (porção de tecido queratinizado); fratura do implante; comprometimento da crista óssea (deiscência e fenestrações, posição do implante); procedimentos de enxerto ósseos mal sucedidos; gengivite descamativa; e medicamentos bifosfonados (Schwarz; Becker, 2007; Heitz-Mayfield, 2008; Algraffe et al., 2011)

1.2 Aspectos microbiológicos envolvidos na peri-implantite

A estabilização da microflora subgengival depende da sucessiva colonização da superfície dentária por várias espécies, resultando em um complexo formado principalmente por bactérias Gram-negativas e anaeróbias, observado nos sítios periodontais doentes (Belibasakis, 2013). Em 2008, Shibli et al. realizaram estudos microbiológicos em humanos e em animais, no qual foi avaliado os tecidos peri-implantares isolados de implantes dentários, clinicamente saudáveis e doentes. Os autores demonstraram uma dispersa microbiota dominada por cocos e bacilos Gram positivos facultativos em tecidos saudáveis. Nos tecidos peri-implantares associados a mucosite houve um aumento do número de cocos, bacilos móveis e espiroquetas. Curiosamente, a transição para a peri-implantite foi associada principalmente ao aparecimento de Gram negativos, com mobilidade, e espécies anaeróbias que são comumente encontradas nas periodontites (Belibasakis, 2013).

Na literatura, são encontrados relatos de que a flora microbiana das bolsas peri-implantares é semelhante a encontrada nas bolsas periodontais. Mais especificamente, as três bactérias pertencentes ao “complexo vermelho” e consideradas periodontopatogênicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) podem também ser encontradas em alta quantidade na peri-

implantite (Shibli et al., 2008; Belibasakis, 2013). Patógenos periodontais podem ser detectados em bolsas periodontais aparentemente saudáveis e em sítios de não progressão periodontal. Portanto, tem sido sugerido que os agentes patogênicos em infecções peri-implantares podem ser as bactérias periodontopatogênicas que migram dos dentes para saliva e assim colonizam os implantes (Klinge et al., 2005).

Embora existam semelhanças entre os agentes etiológicos envolvidos na periodontite e peri-implantite, algumas diferenças também tem sido descritas. Tem sido observado que as bolsas peri-implantares apresentam uma maior tendência à abrigar bactérias anaeróbias Gram-negativas, como as espécies de *Fusobacterium*, *Treponema* e bactérias de pigmentação preta como *Prevotella intermedia* e *Staphylococcus* spp. Espécies entéricas e leveduras também foram encontradas em regiões com peri-implantite (Al Radha et al, 2012).

1.3 Aspectos imunológicos do processo inflamatório

Componentes do biofilme bacteriano, como os lipopolissacarídeos (LPS) e toxinas iniciam a resposta imune-inflamatória por ativação das células de defesa do hospedeiro, que incluem as células polimorfonucleares (PMNs), e assim é desencadeada uma resposta contra invasão microbiana. A ativação das células de defesa resulta na produção de mediadores inflamatórios como as citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e enzimas proteolíticas que, por sua vez, alteram o tecido conjuntivo e o metabolismo ósseo (Yucel-Lindberg; Bage, 2013). O processo de defesa frente a uma infecção bacteriana é inicialmente mediado por citocinas pró inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12. Estas citocinas induzem reabsorção óssea por meio da ativação do ligante do receptor ativador do fator de nuclear kappa B (RANKL) que estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos (Darabi et al., 2012).

Os linfócitos T *helper* (Th) conhecidos como células T CD4+, podem se diferenciar durante o processo de ativação do sistema imune, formando diferentes subpopulações de células efetoras caracterizadas pela atividade de diferentes fatores de transcrição que conseqüentemente estimulam a síntese e secreção de diversos tipos de citocinas (Nistala; Wedderburn, 2009). As células Th1 foram

definidas como produtoras de Interferon- gama ($\text{IFN-}\gamma$), e foram consideradas as principais responsáveis pela resposta inflamatória contra bactérias intracelulares, vírus e células tumorais por meio da ativação de macrófagos e células T citotóxicas (Nistala; Wedderburn, 2009). As células Th2, por sua vez, produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-25 e promovem a imunidade humoral pela produção de fatores de crescimento e diferenciação para Linfócitos B (Mckenzie et al., 2006)

O equilíbrio entre fatores inflamatórios e regulatórios é vital para a prevenção de danos aos tecidos durante uma infecção e no controle das respostas contra antígenos próprios (*self-antigens*). As células T regulatórias (Tregs) são caracterizadas por produzirem citocinas e tem sido descritas como reguladoras negativas da resposta do hospedeiro no ambiente periodontal. Regulam especificamente a ativação, proliferação e função efetora das outras subpopulações de células T ativadas (Graves et al., 2011).

Mais recentemente, uma outra subpopulação de células Th efetoras tem sido descrita, a linhagem de células Th17. Tem sido relatado que esta subpopulação apresenta importante participação na patogênese de lesões teciduais mediadas por células, principalmente pela resposta imune à infecções microbianas (Ohyama et al., 2009).

As subpopulações Th1 e Th17 promovem a resposta inflamatória pela produção de citocinas como o $\text{IFN-}\gamma$ e IL-17, respectivamente. Por outro lado, as células Treg controlam a inflamação através de múltiplos mecanismos que incluem a produção da citocina IL-10 e do fator transformador do crescimento ($\text{TGF-}\beta$) (Chen et al., 2011). O $\text{TGF-}\beta$ suprime o perfil de resposta Th1, assim como a produção de $\text{IFN-}\gamma$. $\text{TGF-}\beta$ também promove o desenvolvimento e a manutenção das células Tregs (Ohyama et al., 2011). Estas funções imunoregulatórias do $\text{TGF-}\beta$ tem forte influência nas interações com células dendríticas que atuam como intermediárias entre o sistema imune inato e adaptativo, através da integração de sinais derivados de patógenos e liberação de mediadores imuno-moduladores (Veldhoen et al., 2006). Juntamente com os mastócitos, a molécula de $\text{TGF-}\beta$ é essencial para a produção de colágeno. $\text{TGF-}\beta$ é uma citocina bem conhecida pelo seus efeitos potenciais na reparação, regeneração e regulação da matriz de metaloproteinases (Araújo et al., 2014).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que induz a síntese de outras citocinas e enzimas de degradação tecidual, incluindo IL-6 e metaloproteinases de matriz (MMPs). Também está envolvida com o processo de osteoclastogênese por induzir a expressão de RANKL nos osteoblastos, da molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e de prostaglandina E2 (Ohyama et al, 2011). Atualmente o papel da IL-17 nas doenças periodontais tem sido estudado e alguns estudos recentes demonstraram o aumento dos níveis desta citocina no fluido gengival de indivíduos com periodontite crônica, o que poderia induzir a produção de outras citocinas inflamatórias e assim contribuir para a patogênese da doença por aumentar a perda óssea (Darabi et al., 2013).

A IL-23 é uma das mais intrigantes citocinas, produzida principalmente por células dendríticas e células epiteliais, com funções exclusivas na diferenciação e expansão de células T de memória. É reportado que a IL-23 tem um papel muito importante na diferenciação e proliferação das células Th17. A IL-23 tem sido associada com várias doenças inflamatórias, como artrite reumatóide (Ohyama et al., 2009), psoríase (McKenzie et al., 2006) e também em doenças orais, como periodontites (Luo et al., 2012).

1.4 Envolvimento da resposta inflamatória com a perda óssea

A reabsorção óssea, é um processo bem regulado que depende da diferenciação de monócitos em osteoclastos capazes de realizar a reabsorção óssea. Embora a formação e reabsorção óssea sejam processos que ocorrem continuamente no osso alveolar saudável, na peri-implantite ocorre a perda do equilíbrio normal e o aumento da reabsorção por meio da ativação de mecanismos que incluem o aumento da ativação de osteoclastos (Yucel-Lindberg; Båge, 2013).

À nível molecular, a reabsorção óssea ocorre principalmente por intermédio de três moléculas-chave, o receptor-ativador do fator nuclear κ B (RANK), seu ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). O mecanismo de reabsorção

óssea é significativamente reduzido por meio de OPG, que inibe a função RANKL nas células osteoclásticas (Trouvin;Goeb, 2010).

OPG é uma glicoproteína secretada que tem um importante papel na inibição da interação RANKL/RANK, além disso, a OPG regula o sistema imunológico através da diminuição da sobrevivência de células dendríticas (Guncu et al., 2012). OPG inibe a destruição do osso alveolar induzida pela periodontite pela diminuição do número de osteoclastos (Guncu et al.,2012).

RANK é uma proteína transmembrana expressa na membrana plasmática de progenitores de osteoclastos, osteoclastos maduros, macrófagos, monócitos, células dendríticas, condrócitos, células endoteliais e fibroblastos (Khosla, 2001; Rogers;Eastell, 2005; Kim et al., 2008; Senta et al., 2009; Gurban;Mederle, 2011). RANKL é o ligante do RANK expresso na superfície de células estromais da medula óssea, pré-osteoblastos, osteoblastos, fibroblastos, células B e T ativadas, condrócitos, macrófagos e células endoteliais (Rogers;Eastell, 2005; Bostanci et al., 2007; Kearns et al., 2008; Kim et al., 2008; Senta et al., 2009; Chen et al., 2011; Franek, 2011; Lee et al., 2011).

O sistema bi-molecular RANKL/OPG é o regulador da osteoclastogênese e da reabsorção óssea, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Belibasakis e Bostanci, 2012). A expressão de RANKL e OPG são reguladas por estímulos sistêmicos e locais, incluindo fatores de crescimento, citocinas, hormônios, mediadores inflamatórios, produtos bacterianos e drogas imunossupressoras (Hofbauer;Heufelder, 2001; Bostanci et al., 2007). A dupla osteoblastos-osteoclastos tem uma contínua interação na presença desse sistema molecular, com um importante papel no mecanismo de regulação da remodelação óssea (Boyle et al., 2003; Gurban;Mederle, 2011).

Citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, fator de estimulação de colônias de macrófagos (MCS-F), IL-17 e PGE2 estão entre os mediadores pró-inflamatórios considerados mais importantes para estimular a ativação dos osteoclastos (Yucel-Lindberg; Båge, 2013). A IL-17 também é responsável por induzir outras citocinas pró inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e IL-8, e foi encontrada em quantidade elevada em pacientes com doença periodontal, especialmente aqueles com diabetes. Outra importante função da IL-17 é a sua capacidade de induzir a ativação dos osteoclastos, o que pode tornar o microambiente do implante um nicho propício à

perda óssea e conseqüentemente a perda do implante (Severino et al., 2011).

Por outro lado, IL-4, IL-13 e TGF- β podem ser considerados agentes anti-reabsortivos pela supressão da osteoclastogênese (Guncu et al., 2012). O TGF- β desempenha um papel crucial na formação e atividade dos osteoclastos (Sriarj et al., 2013). Foi demonstrado que o efeito do TGF- β os osteoclastos depende do sistema de cultura que é utilizado. Ele inibe a osteoclastogênese quando adicionado à uma co-cultura de osteoblastos e células hematopoiéticas, mas reforça a osteoclastogênese na presença de RANKL ou TNF- α estimulados por células hematopoiéticas (Guber et al., 2013; Sriarj et al., 2013). Consta que o TGF- β liga-se ao receptor de Th2, que por sua vez ativa o receptor de Th1 (Guber et al., 2013).

Sabendo-se que nas últimas décadas o número de implantes dentários instalados vem crescendo cada vez mais e que a peri-implantite é uma doença infecto-inflamatória, estudos que esclareçam os mecanismos imuno-inflamatórios envolvidos na patogênese da peri-implantite são de grande importância para contribuir para a descoberta de novas terapias que possam prevenir a perda do implante.

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resposta promovido por células T regulatórias e Th17 em indivíduos com periimplantite por meio da análise dos níveis de expressão gênica para TGF- β , IL-17 e IL-23.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

TGF- β , IL-17 and IL-23 gene expression profiles associated with peri-implantitis

ABSTRACT

Aim: The mRNA expression profiles of IL-23/Th17 and the Treg-associated cytokine TGF- β in peri-implantitis disease have been poorly studied. This study characterized the IL-17, IL-23, and TGF- β gene expression levels in healthy peri-implant and peri-implantitis tissues.

Methods: Forty subjects (20 healthy and 20 peri-implantitis patients) were enrolled and real time PCR (RT-PCR) was used to define the IL-17, IL-23, and TGF- β gene expression profiles.

Results: Radiographic analysis demonstrated that the peri-implantitis group presented with greater levels of bone loss compared to the healthy controls. Higher levels of TGF- β mRNA were observed in biopsies taken from healthy control and the IL-23 mRNA levels were significantly increased in the peri-implantitis group ($p < 0.05$). No differences in IL-17 mRNA levels were observed between groups.

Conclusions: Data presented in this report demonstrated a predominant Th17 response in peri-implantitis cases based on the higher levels of IL-23 and lower levels of TGF- β detected.

Keywords: Th1; Th2; peri-implantitis; cytokines; IL-17; IL-23; TGF- β ; gene expression; RT-PCR

INTRODUCTION

Endosseous dental implants are associated with high success rates and are necessary for both functional and esthetic reasons (Sakka et al., 2012). However,

dental implant surfaces facilitate microbial colonization and biofilm formation resulting in infections associated with peri-implant tissues (Belibassakis et al., 2014). Initially, bacterial biofilm formation elicits a reversible inflammatory reaction known as mucositis that remains localized to the soft tissues surrounding the implant. If biofilm accumulation persists, the inflammatory response may increase, thereby promoting the gradual destruction of deeper tissues leading to implant loss (Mombelli, 2000; Heitz-Mayfield, 2008; Duarte et al., 2009). Therefore, peri-implantitis is defined as an irreversible process that affects the soft and hard tissues and is considered to be the most important cause of late failure dental implants (Listgarten, 1997; Algraft et al., 2012). Although bacterial biofilm formation may be considered a key first step towards peri-implantar disease progression, the immuno-inflammatory response generated by the bacterial stimuli is responsible for the tissue injury associated with peri-implantitis.

In vivo activation of CD4⁺ T cells results in the generation of effector populations that may contribute to progression of the inflammatory response (Zhu et al., 2010). Elicitation of the adaptive immune response was originally thought mediated by 2 subpopulations of effector CD4⁺ T cells: T helper 1 (Th1) and Th2 cells that were defined only by the cytokines each subset produced (Mossman et al., 1986). This “polarization model” developed depending on the nature of the stimuli, that is, Th1 cells/cytokines were elicited in response to certain bacterial or viral stimuli and Th2 cells/cytokines were associated primarily with responses elicited in response to helminthic infections (Abbas et al., 1996; Glimcher and Murphy, 2000). This paradigm has now been modified following the characterization of Th17 and Treg CD4⁺ helper T cells (Dong, 2008; Martinez et al., 2008). Treg cells present the ability to produce the transforming growth factor (TGF)- β , IL-10, and IL-35 (Vignali et al., 2008). This cell population in many ways opposes responses elicited by Th17 cells.

Th17 are characterized by the production of IL (Interleukin)-17 that mediates several biological functions associated with the pro-inflammatory response including neutrophil and macrophage recruitment (Laan et al., 1999; Sergejeva et al., 2005; Dong et al., 2009), stimulation of proinflammatory cytokine synthesis, and production of anti-microbial peptides from a variety of immune and nonimmune cells (Kolls and Linden, 2004; Ouyang et al., 2008). Moreover, immune responses

mediated by Th17 cells are highly dependent on the pro-inflammatory cytokine IL-23 that is produced by dendritic cells and is often referred to as the IL-23/Th17 axis (Crome et al., 2010). Several studies have found a direct involvement of IL-23 in the development of Th17 cells in humans and in *in vitro* models (Volpe et al., 2009).

Although immune responses associated with chronic periodontitis have been described, including a pathogenic role for IL-17 (Takahashi et al., 2005; Vernal et al., 2005; Ohshima et al., 2009; Garlet, 2010) only a few studies have evaluated the involvement of Tregs and the IL-23/Th17 axis in the pathology of peri-implantitis (Severino et al., 2011; Darabi et al., 2013; Luo et al., 2013). Therefore, the present study evaluated the TGF- β , IL-17, and IL-23 gene expression levels in peri-implantitis and healthy tissues

MATERIAL AND METHODS

Study subjects

Forty subjects were enrolled in the present study from the Periodontal Clinic of Guarulhos University between February 2009 and February 2012. Patients that were partially or totally edentulous and received at least one titanium implant were included in the study. All subjects were non-smokers, non pregnant or lactating, and were systemically and periodontally healthy. Exclusion criteria included the use of oral or topical antibiotics and anti-inflammatory agents during the previous 6 months. The Guarulhos University's Ethics Committee approved the study protocol.

Experimental design

One peri-implant soft tissue biopsy was obtained from each subject undergoing anti-infective surgery for peri-implant lesions or non-disease-related reasons. The healthy (n=20) and peri-implantitis groups (n=20) were comprised of subjects that fulfilled the inclusion and exclusion criteria and exhibited bone loss ≤ 2 mm and ≥ 4 mm by radiographic analysis, respectively. If the same subject had both healthy and diseased implants the implant with the worst diagnosis was used and if 2

or more implants presented with a similar clinical diagnosis the most anterior implant was chosen for sampling.

RNA extraction and Reverse transcription

Biopsies were stored in a tube containing RNA later (Ambion Inc., Austin, TX, USA) at - 20°C and the TGF- β , IL-17, and IL-23 mRNA levels subsequently evaluated. Gene expression levels of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used as a reference. Total RNA was extracted from respective tissue samples using the Trizol[®] method (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) according of the manufacturer's recommendation. RNA was suspended in diethylpyrocarbonate-treated water, DNase treated (Turbo DNA-free, Ambion Inc., Austin, USA), and stored at -70°C until use. RNA concentrations were determined by the micro-volume spectrophotometer (Nanodrop 1000, Nanodrop Technologies LLC, Wilmington, NC, USA). Afterwards, 1 μ g of total RNA was used to synthesize cDNA using the first-strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostic Co., Indianapolis, USA) as described by the manufacturer.

Real-time PCR reactions

The primers used to amplify mRNA corresponding to the TGF- β , IL-17, and IL-23 sequences for quantitative PCR analysis were designed using the Light-Cycler probe design software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The primer sequences, the amplification profiles, and amplicon length are described in Table 1.

Quantitative PCR was carried out using the LightCycler System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as recommended by the manufacturer (Syber Green, FastStart DNA Masterplus Syber Green, Roche Diagnostic Co., Indianapolis, USA). Results were expressed as relative quantification to the GAPDH gene expression levels.

Table 1- Primer sequences, amplification profiles, and estimated amplicon length.

TGF- β = transforming growth factor β , IL-17 = interleukin 17; IL-23 = interleukin 23, GAPDH = glycerin-aldehyd-3-phosphate-dehydrogenase.

Gene	Sequence (5' – 3')	Amplification profile [temperature (°C)/ time (s)]	Amplicon size (bp)
TGF- β	F: GCAACAATTCCTGGCGATAC	95/10 56/10, 72/7	181
	R: TCCACTTGCAGTGTGTGTATCC		
IL-17	F: GGTTTGACTGAGTACCAATTTGC	95/10, 56/5, 72/7	172
	R: AAATTCCAAGCCCAGAATC		
IL-23	F: CTGGGAGACTCAGCAGATTC	95/10, 56/7, 72/6	151
	R: CCTTTAGGGACTCAGGGTTG		
GAPDH	F: CTGAGTACGTCGTGGAGTC	95/10, 56/5, 72/7	187
	R: TGATGATCTTGAGGCTGTTGTC		

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were first examined for normality using the Kolmogorov-Smirnov test and consequently, gene expression levels were consequently analyzed by Mann Whitney non-parametric test. Age and radiographic data were evaluated using the unpaired *t* test and gender frequency was assessed by the Chi-squared test. Spearman's Rank Correlation test was used to test possible relationships between gene expression levels and the radiographic data to the sampled sites. The significance level established for all analyses was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Forty subjects were enrolled in the present study. The healthy group (n=20) consisted of 11 men and 9 women with a mean age of 59.4 ± 6.3 years and the peri-implantitis group (n=20) consisted of 8 men and 12 women with a mean age of 56.6 ± 5.5 years. No differences in the mean age and sex distribution between groups were observed ($p > 0.05$). As expected, the peri-implantitis group presented significantly greater bone loss compared to bone loss observed in healthy control ($p < 0.001$). The radiographic bone loss value for the healthy group was 0.93 ± 0.13 mm and 4.0 ± 0.56 mm for the peri-implantitis group.

Higher mRNA TGF- β levels were observed in healthy biopsies ($p < 0.0001$), conversely, the gene expression levels of IL-23 were significantly increased in the peri-implantitis group ($p < 0.05$) (Figure 1A-C). Unexpectedly, no differences in IL-17 mRNA levels were observed. Furthermore, no statistically significant correlations were established between radiographic parameters and gene expression levels ($p > 0.05$).

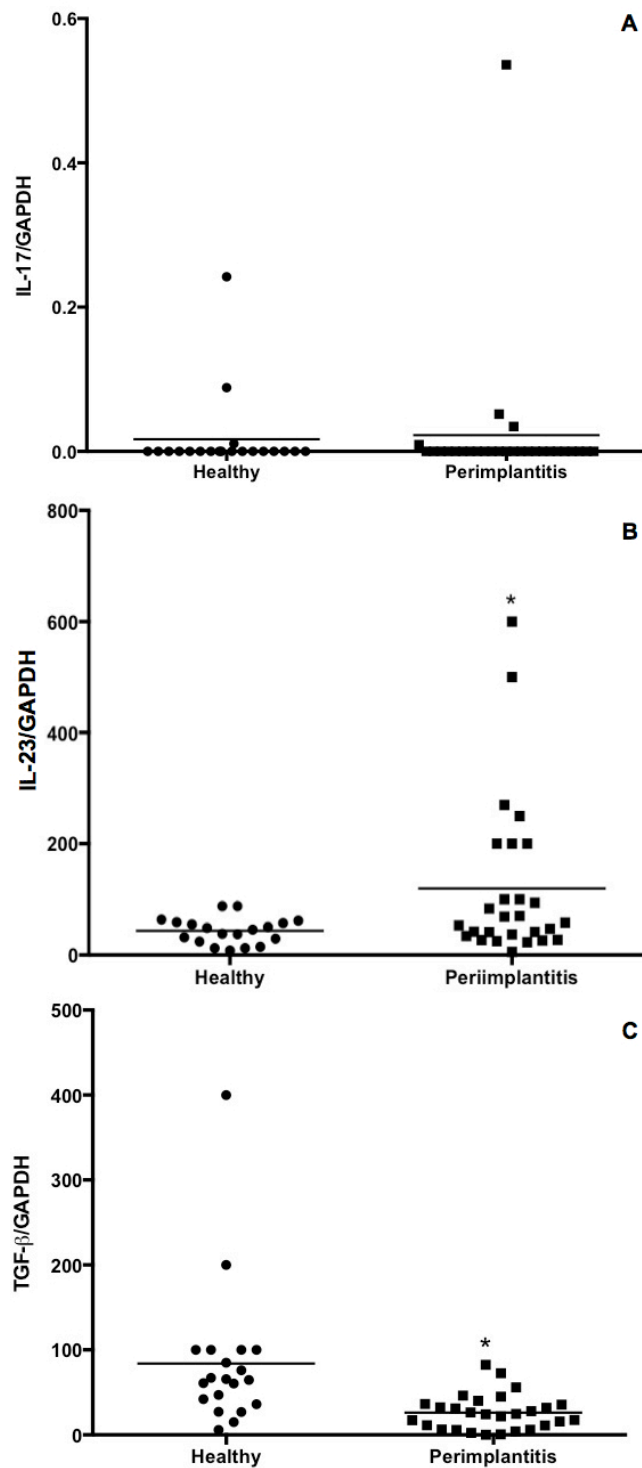


Figure 1. Gene expression levels of IL-17 (A), IL-23 (B), and TGF- β (C) in the peri-implant tissues of healthy subjects or subjects presenting peri-implantitis. Expression levels are relative to the expression level of the housekeeping gene GAPDH (glycerin-aldehyd-3- phosphate-dehydrogenase). Horizontal bars represent median values. *Differences between groups (Mann Whitney test; $p < 0.05$).

DISCUSSION

It has been suggested that imbalances between Th1-, Th2-, Th17-, and Treg-type associated cytokines are critical to the prognosis of periodontal lesions (Seymour and Gemmel 2001, Ukai et al. 2001, Teng 2002, Garlet et al. 2003). Although increased levels of some pro-inflammatory cytokines have also been described in sites of peri-implantitis (Venza et al., 2010; Kontinnen et al., 2006) only a few studies have characterized the Th17 and Treg cytokine profiles in peri-implantitis tissues (Severino *et al.*, 2011; Darabi et al., 2013; Luo et al., 2013).

The present study characterized the Treg (TGF- β) and Th17 (IL-17 and IL-23) cytokine gene expression levels in both healthy and peri-implantitis tissues. Results identified a predominant Th17 response and a decreased Treg response in peri-implantitis tissues compared to the cytokine profile observed in healthy tissues. This observation was further supported by the elevated levels of IL-23 and lower levels of TGF- β detected in peri-implantitis tissues.

Although increased IL-23 levels in gingival tissues have been associated with attachment loss (Lester et al., 2007) to our knowledge only 1 study evaluated the IL-23 levels in association with peri-implantitis sites (Luo et al., 2013). Similar to our findings, Luo et al. (2013) also observed higher gene expression levels of IL-23 in peri-implantitis tissues compared to healthy tissues. In addition, Luo et al. demonstrated a greater proportion of IL-23 positive cells in peri-implantitis tissues by immunohistochemistry. IL-23 is essential to the maintenance and expansion of Th17 cells and plays a critical role in driving the initial inflammatory immune response against pathogens by inducing IL-17 production and recruiting neutrophils (Miossec and Kolls, 2012).

Unexpectedly, in the present study were not detected differences in IL-17 gene expression levels between peri-implantitis and healthy tissues. This result is in contrast to data presented by both Severino et al. (2011) and Darabi et al. (2013), which demonstrated increased levels of IL-17 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. In addition, the observed elevated IL-17 levels were significantly associated with increased probing depth (Darabi et al., 2013).

Differences in the methodologies used to detect IL-17, severity and duration of peri-implantitis could explain these conflicting results. IL-17 is a pro-

inflammatory cytokine that stimulates the production of a series of pro-inflammatory mediators (Tesmer et al., 2008), matrix metalloproteinases (MMP) and osteoclastogenesis related-factors (Oda et al., 2003, Takahashi et al., 2005, Sato , 2006, Beklen et al., 2007).

TGF- β is a cytokine with pleiotropic and sometimes opposing effects on the regulation of inflammatory processes, that is, TGF- β can down-regulated the production of pro-inflammatory cytokines that limit tissue degradation or can stimulate differentiation of pro-inflammatory Th17 cells depending on the microenvironment (Zhou et al., 2008; Dardalhon et al., 2008). Shull et al., (1992) described that *Knockout* mice for a certain TGF- β presented a multifocal inflammatory cell response and tissue necrosis associated with organ failure and death. Although, no studies have compared TGF- β gene expression levels in healthy and peri-implantitis tissues, some studies have suggested that TGF- β is critical to the health of peri-implant tissues (Schierano et al., 2000, Schierano et al., 2001, Schierano et al., 2003, Bordin et al., 2009). In accordance with our results, an *in vitro* study demonstrated that TGF- β levels were lower in stromal cell cultures from peri-implantitis cases than in cultures derived from healthy gingival fibroblasts (Bordin et al., 2009). Other studies evaluated the involvement of TGF- β in dental implant survival (Schierano et al., 2000; Schierano et al., 2001; Schierano et al., 2003). Schierano *et al.* (2003) evaluated both the mRNA expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and peri-implant tissue morphometry of soft tissues from patients before and during treatment with Brånemark titanium implants. The authors described higher TGF- β mRNA levels in the gingival mucosa from pre-surgery edentulous patients and suggested that TGF- β expression during implantation was linked to successful implant osseointegration, induction of bone formation, and effects on the orientation, growth, and adhesion-molecule expression profiles of human gingival fibroblasts (Schierano et al., 2000; Schierano et al., 2001).

A better understanding of the immune-regulatory mechanisms associated with peri-implantitis has been the focus of some studies as a means of identifying biological markers useful in the diagnosis of disease and/or that could be used as targets of novel therapeutics approaches. However, since the immune response is regulated by a complex network of cytokines, imbalances between pro- and anti-inflammatory responses may be responsible for the observed immune-pathogenesis

associated with peri-implantitis, making it more difficult to identify pertinent biomarkers.

In conclusion, in the present described increased levels of IL-23 and decreased levels of TGF- β in peri-implantitis tissues, suggesting polarization towards a Th17 response. One limitation of the present study was the number of mediators analyzed and the absence of others clinical parameters for correlation analyses. Therefore, additional studies designed to evaluate additional cytokines associated with the different Th cells profiles need to be carried out to further characterize the mechanisms involved in the pathogenesis of peri-implantitis.

REFERENCES

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):787-93.

Algraffee H, Borumandi F, Cascarini L. Peri-implantitis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Dec;50(8):689-94.

Beklen A, Ainola M, Hukkanen M, Gürkan C, Sorsa T, Konttinen YT. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*. 2007Apr;86(4):347-51.

Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol*. 2014 Jan;59(1):66-72.

Bordin S, Flemmig TF, Verardi S. Role of fibroblast populations in peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Mar-Apr;24(2):197-204.

Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol*. 2010 Feb;159(2):109-19.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells

and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1347–1355.

Darabi E, Kadkhoda Z, Amirzargar A. Comparison of the levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in gingival crevicular fluid of patients with peri-implantitis and a control group with healthy implants. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013 Mar;12(1):75-80.

Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):337-48.

Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):584-8.

Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti Júnior FH. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):514-20.

Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2003 Apr;38(2):210-7.

Garlet GP. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1349-63.

Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1693-711.

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

Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):467-76.

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;26(2):135–41.

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):2347-52.

Lester SR, Bain JL, Johnson RB, Serio FG. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol*. 2007 Aug;78(8):1545-50.

Listgarten MA. Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation. *Ann Periodontol*. 1997 Mar;2(1):299-313.

Luo Z, Wang H, Sun Z, Luo W, Wu Y. Expression of IL-22, IL-22R and IL-23 in the peri-implant soft tissues of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol*. 2013 May;58(5):523-9.

Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:188-21.

Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Oct;11(10):763-76.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-2357.

Mombelli A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2002;28:177-89.

Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:451-94.

Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially

stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Feb;18(1):30-6.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J, Terada N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 2009 Jul;88(7):633-8.

Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):454-67.

Sakka S, Baroudi K, Nassani MZ. Factors associated with early and late failure of dental implants. *J Investig Clin Dent.* 2012 Nov;3(4):258-61.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2673-82.

Schierano G, Bassi F, Gassino G, Mareschi K, Bellone G, Preti G. Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. *J Dent Res.* 2000 Sep;79(9):1675-82.

Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol.* 2001 Dec;72(12):1658-65.

Schierano G, Bellone G, Cassarino E, Pagano M, Preti G, Emanuelli G. Transforming growth factor-beta and interleukin 10 in oral implant sites in humans. *J Dent Res.* 2003 Jun;82(6):428-32.

Sergejeva S, Ivanov S, Lötvall J, Lindén A. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Sep;33(3):248-53.

Severino VO, Napimoga MH, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Arch Oral*

Biol. 2011 Aug;56(8):823-8.

Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*. 2001 Jun;59(3):167-73.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992 Oct 22;359(6397):693-9.

Takahashi K, Azuma T, Motohira H, Kinane DF, Kitetsu S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):369-74.

Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5269-73.

Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev*. 2008 Jun;223:87-113.

Ukai T, Mori Y, Onoyama M, Hara Y. Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. *Arch Oral Biol*. 2001 Oct;46(10):901-8.

Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol* 2010;81(1):99-108.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Apr;32(4):383-9.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523-32.

Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical

function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):650-7.

Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 2008;453:236–240.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89.

4 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos no presente estudo é possível sugerir que houve um predomínio do perfil de resposta Th17 nos tecidos peri-implantares com periimplantite enquanto que nos tecidos peri-implantares saudáveis foi observado um predomínio do perfil de células Treg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Academy of Periodontology. Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Current Understanding of Their Diagnoses and Clinical Implications. The American Academy of Periodontology (AAP) periodically publishes reports, statements, and guidelines on a variety of topics relevant to periodontics. *J Periodontol*. April 2013. Vol.84. Number 4.

Algraft H, Borumandi F, Cascarini L. Peri-implantitis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Dec;50(8):689-94. doi: 10.1016/j.bjoms.2011.11.020. Epub 2011 Dec 22.

Al-Radha AS, Pal A, Petteimerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dent*. 2012 Nov;40(11):989-98. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.006. Epub 2012 Aug 20.

Araújo MF, Leão Filho AF, da Silva GP, de Melo MLR, Napimoga MH, Rodrigues DBR, Alves PM, Pereira SAL. Evaluation of peri-implant mucosa: Clinical, histopathological and immunological aspects. *Archives of oral biology*. Vol.59. (2014) 470–478.

Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol*. 2014 Jan;59(1):66-72.

Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Töz H, Berdeli A, Atilla G, McKay IJ, Hughes FJ, Belibasakis GNJ . Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *Periodontal Res*. 2007 Aug;42(4):287-93.

Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012 Mar; 39(3):239-48.

Chen Y, Haines CJ, Gutcher I, Hochweller K, Blumenschein WM, McClanahan T, Hämmerling G, Li MO, Cua DJ, McGeachy MJ. Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. *Immunity*. 2011 Mar 25;34(3):409-21. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.011.

Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JE. *J Clin Periodontol*. 2012 Feb;39(2):173-81.

Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt A, Dahle'n G. A follow-up study of peri-implantitis cases after treatment. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 864–871

Darabi E, Kadkhoda Z, Amirzargar A. Comparison of the levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in gingival crevicular fluid of patients with peri-implantitis and a control group with healthy implants. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013

Mar;12(1):75-80. doi: 012.01/ijaai.7580.

Franek E. Denosumab - a new option in the treatment of osteoporosis. *Endokrynol Pol.* 2011; vol. 62. Suppl 2:37-41

Gruber R, Roos G, Caballé-Serrano J, Miron R, Bosshardt DD, Sculean A. TGF- β RI kinase activity mediates Emdogain-stimulated in vitro osteoclastogenesis. *Clin Oral Investig.* 2013 Nov 13.

Gurban C.V.; Mederle O. The OPG/RANKL system and zinc ions are promoters of bone remodeling by osteoblast proliferation in postmenopausal osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(3 Suppl):1113-9.

Güncü GN, Akman AC, Günday S, Yamalık N, Berker E. Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. *Cytokine.* 2012 Aug;59(2):313-6.

Heitz-Mayfield L.J.A., G. E. Salvi, A. Mombelli, M. Faddy, N. P. Lang. Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clin. Oral Impl. Res.* 23, 2012 / 205–210.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008 Apr;29(2):155-92.

Kim BJ1, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, Jeong JS, Shin SH. A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 May;113(5):583-92. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.029. Epub 2011 Aug 10.

Klinge B, Hultin M., Berglundh T. Peri-implantitis. *Dent Clin N Am* 49 (2005) 661–676.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5050-5. Review.

Cho-Yan Lee J, Mattheos N, Nixon KC, Ivanovski S. Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Mar;23(3):325-33. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02264.x. Epub 2011 Aug 5.

Luo Z, Wang H, Sun Z, Luo W, Wu Y. Expression of IL-22, IL-22R and IL-23 in the peri-implant soft tissues of patients with peri-implantitis. *Archives of oral biology* 58 (2013) 523–529.

McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006 Jan;27(1):17-23. Epub 2005 Nov 14

Nistala K.; Wedderburn L.R.. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology* 2009;48:602–606. 5 March 2009.

Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho M, Yamanegi K, N. Yamada, M. Hata, J. Yamane and N. Terada. The Involvement of IL-23 and the Th17 Pathway in Periodontitis. *J DENT RES*, 2009, 88: 633.

Renvert S; Persson GR. Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36 (Suppl. 10): 9–14.

Renvert S. Polyzois I, Claffey N. Surgical therapy for the control of peri-implantitis. *Clin. Oral Implants Res.* 23(Suppl. 6), 2012/84–94.

Renvert S, Lindahl C, Roos Jansaker A-M, Persson GR. Treatment of peri-implantitis using Er:YAG laser or an air-abrasive device: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 65–73.

Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Nov;90(11):6323-31. 2005 Aug 16.

Senta H, Park H, Bergeron E, Drevelle O, Fong D, Leblanc E, Cabana F, Roux S, Grenier G, Faucheux N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Jun;20(3):213-22.

Severino VO, Napimoga MH, de Lima Pereira SA. Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2011 Aug;56(8):823-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.01.006. Epub 2011 Feb 8.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct;19(10):975-82. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x.

Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):273-81.

Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takahashi M, Takagi Y, Shimokawa H. TGF- β in dentin matrix extract induces osteoclastogenesis in vitro. *Odontology.* 2013 Dec 24.

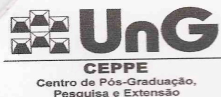
Schwarz F.; Becker J. Peri-implant Infection: Etiology, Diagnosis and Treatment. Editora Quintessence. 2007.

Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging.* 2010 Nov 19;vol.5:345-54.

Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, Stockinger B. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2006 May 15;176(10):6202-10.

Yucel-Lindberg T; Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. doi:10.1017/erm.2013.8; Vol. 15; e7; August 2013.

ANEXO



Guarulhos, 11 de novembro de 2008.

Exmo. Sr.
Prof. Jamil A. Shibli

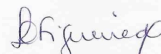
PARECER Nº 113/2008

Referência: **Aprovação de Projeto**
SISNEP/379 - "Efeitos do laser Er:Cr:YSGG associado a antibioticoterapia sistêmica no tratamento cirúrgico da periimplantite"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Efeitos do laser Er:Cr:YSGG associado a antibioticoterapia sistêmica no tratamento cirúrgico da periimplantite" - SISNEP/379, na reunião de 11.11.2008, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **15.10.09** e relatório final até **15.10.10**.



Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

