



**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**JORGE TAIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES  
LIGADOS À REAÇÃO DE CORPO ESTRANHO NO  
TECIDO PERI-IMPLANTAR COM E SEM PERI-  
IMPLANTITE.**

**Guarulhos**

**2015**

**JORGE TAIRA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES LIGADOS  
À REAÇÃO DE CORPO ESTRANHO NO TECIDO PERI-  
IMPLANTAR COM E SEM PERI-IMPLANTITE.**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos  
para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**Área de Concentração:** Implantodontia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Giro Araujo

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Ferreira Bastos

**Guarulhos**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

T129a

Taira, Jorge

Avaliação da expressão gênica de fatores ligados à reação de corpo estranho no tecido peri-implantar com e sem peri implantite. / Jorge Taira. -- 2015.

31 f.; 31 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2015.

1. Peri-implantite 2. Expressão gênica 3. IL-4 4. MIP-1 alfa 5. MMP-9 6. Reação de corpo estranho 7. Etiologia 8. Progressão da doença peri-implantar T I. Título II. Araujo, Gabriela Giro, (Orientador). III. Universidade Guarulhos.

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "A AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMP-9, MIP-1 $\alpha$  E IL-4, FATORES LIGADOS À REAÇÃO DE CORPO ESTRANHO, EM TECIDO PERI-IMPLANTAR COM E SEM PERI-IMPLANTITE" em sessão pública realizada em 26 de Março de 2015, considerou o candidato JORGE TAIRA aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

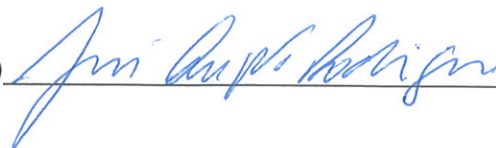
1. Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo (UnG)



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



3. Prof. Dr. José Augusto Rodrigues (UnG)



Guarulhos, 26 de Março de 2015.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

*Charles Chaplin*

Dedico esta dissertação aos meus ancestrais: Família Taíra e Família Taminato,  
que me ensinaram o valor da FAMÍLIA.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à DEUS pela oportunidade da VIDA.

À minhas princesinhas que tanto amo: Ananda e Bianca, pois me estimulam e me alegram todas as vezes que abro os olhos e levanto para um novo dia.

À Elizabeth Carvalho pelo amor, carinho, paciência e compreensão.

À UnG através de seus funcionários e colaboradores oferecendo um local digno e adequado para o desenvolvimento da pesquisa científica.

À minha orientadora Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo e minha co-orientadora Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos pela paciência, eficiência e seriedade que me conduziram para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli pelo seu suporte em todos os momentos do curso de Mestrado.

Aos Docentes de Mestrado em Implantodontia pela sabedoria demonstrada na transmissão dos conhecimentos: Profª Drª. Magda Feres, Profª Drª. Luciene Cristina de Figueiredo, Profª Drª. Alessandra C. Ferreira, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof. Dr. Marcelo de Faveri, Prof. Dr. André Figueiredo e Profª Drª. Poliana Duarte.

Aos meus amigos da turma do curso de Mestrado, o meu muito obrigado pelo companheirismo.

Ao colega e amigo Ricardo E. Jugdar pelo incentivo e oportunidades nesta fase de superação.

À colega e amiga Sonia Kushima pela palavras sempre incentivadoras.

Aos meus incentivadores Francisco Morgante e Pedro Pita por acreditarem que eu poderia seguir na Implantodontia.

Aos meus amigos e irmãos de alma, Marco A.R. Froio e Wesley A. P. Nunes, por todo o apoio.

## RESUMO

A peri-implantite tem sido considerada uma doença infecto-inflamatória, que leva a perda óssea ao redor de implantes osseointegrados em função na cavidade oral. Vários estudos tem sido realizados para melhor compreensão dos mecanismos imuno-inflamatórios responsáveis pela patogênese da peri-implantite. No entanto, recentemente foi sugerido que a perda óssea observada na peri-implantite seria provocada por uma reação desencadeada por proteínas do sistema imunológico em resposta ao implante inserido no tecido ósseo. Desta forma, a injúria tecidual causada pela perfuração do tecido ósseo provocaria a infiltração de células inflamatórias, que resultaria no desencadeamento de uma inflamação crônica de pequena magnitude. Embora imperceptível clinicamente, esta reação promoveria a adesão de monócitos e macrófagos, seguidos pela diferenciação e fusão de macrófagos, formando então as células gigantes, características das reações de corpo estranho. Baseado nesta hipótese, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de expressão gênica de Interleucina (IL)-4, da proteína inflamatória de macrófagos tipo 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) e da metaloproteinase (MMP)- 9, fatores envolvidos na formação das células gigantes características da reação de corpo estranho, nos tecidos peri-implantares saudáveis e com peri-implantite. Para isso, 35 indivíduos (15 saudáveis e 20 com peri-implantite) foram incluídos neste estudo seguindo os critérios de inclusão e exclusão. As biópsias de tecidos peri-implantar 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 de IL-4, MIP-1 $\alpha$  e MMP-9 em relação ao gene de referencia, foram analisados pelo método não paramétrico de Mann Whitney com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram um aumento na expressão de IL-4 para o grupo com peri-implantite, em relação ao Grupo Controle. Porém, não foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao MIP-1 $\alpha$  e MMP-9. Dentro de suas limitações, os resultados deste estudo não apresentaram nenhuma evidência da ocorrência da reação de corpo estranho nos tecidos acometidos por peri-implantite.

**Palavras-Chaves:** Peri-implantite. Expressão gênica. IL-4. MIP-1 alfa. MMP-9. Reação de corpo estranho. Etiologia. Progressão da doença peri-implantar.



## ABSTRACT

Peri-implantitis has been considered an infectious-inflammatory disease that leads to bone loss around dental implants under masticatory function in the oral cavity. Several studies have been conducted to better understand the immunoinflammatory mechanisms responsible for the pathogenesis of peri-implantitis. However, recently it was suggested that bone loss observed in peri-implantitis would be caused by a foreign body reaction triggered by immune system proteins in response to the implant inserted into the bone tissue. Thus, the tissue damage caused by bone drilling would cause the infiltration of inflammatory cells, which would result in the triggering of a chronic inflammation of small magnitude. Although clinically inconspicuous, this reaction would promote the adhesion of monocytes and macrophages, followed by fusion and differentiation of macrophages, thus forming giant cells, characteristic of foreign body reactions. Therefore, this study aimed to evaluate the gene expression levels of interleukin (IL) -4, the macrophage inflammatory protein type 1 alpha (MIP-1 $\alpha$ ) and metalloproteinase (MMP)-9, factors involved in the formation of giant cells characteristics of foreign body reaction in healthy peri-implant tissue and peri-implantitis. For this reason, 35 subjects (15 healthy and 20 with peri-implantitis) were included in this study following the inclusion and exclusion criteria. The peri-implant tissue biopsies were subjected to total RNA extraction, DNase treatment and cDNA synthesis. Subsequently, the reaction of real-time PCR was performed to evaluate the gene expression levels of IL-4, MIP-1 $\alpha$  and MMP-9 in relation to the reference gene. The data were analyzed by the non-parametric test of Mann Whitney, with a significance level 5%. The results showed an increase in IL-4 expression in the group with peri-implantitis, compared to the control group. However, no differences were observed between the groups with respect to MIP-1 $\alpha$  and MMP-9. Within its limitations, the results of this study showed no evidence of the occurrence of foreign body reaction in the tissue affected by peri-implantitis.

**Key-words:** Peri-implantitis. Gene Expression. IL-4. MIP-1 Alfa. MMP-9. Foreign body reaction. Etiology.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	09
2. PROPOSIÇÃO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os implantes dentários são, atualmente, uma das melhores opções para a reabilitação oral de pacientes total ou parcialmente desdentados. Por meio de seu criador, o médico sueco Branemark na década de 60, na Universidade de Gotemburgo (Suécia) inseriu câmaras de titânio na fíbula de coelhos para estudo da micro circulação sanguínea no osso e medula e quando tentou retirar estas câmaras de titânio encontrou dificuldades para removê-las, pois a câmara de titânio estava em contato íntimo com o tecido ósseo. Esse acontecimento levou a descoberta do fenômeno batizado de Osseointegração (do latim os- osso), que já beneficiou milhões de pessoas no mundo e muitas outras continuarão sendo beneficiadas por essa descoberta. Apesar das altas taxas de sucesso desta terapia, são descritos alguns casos de insucessos que podem dar-se precoce ou tardiamente. Falhas precoce ocorre antes ou próximo ao momento da instalação do pilar protético, enquanto as falhas tardias ocorrem após o carregamento do implante (Van Steenberghe et al, 2002). Esta classificação é clinicamente relevante uma vez que estas falhas diferem na sua etiologia. Falhas precoces podem ser associada com trauma, problemas na reparação óssea, fatores sistêmicos e fatores relacionados à técnica cirúrgica (Esposito et al, 1998 a, b). Por outro lado, falhas tardias são normalmente associadas às infecções bacterianas (Van Steenberghe et al., 2002).

Diversos autores demonstraram que as doenças peri-implantares tem origem bacteriana, assim como a doença periodontal, e são caracterizadas como uma doença complexa em resposta à patógenos da microbiota oral que produzem endotoxinas, as quais induzem a produção de citocinas, aumentando o infiltrado inflamatório e a liberação de enzimas proteolíticas responsáveis pela destruição dos tecidos peri-implantares (Mombelli & Lang, 1998; Mombelli, 1999; Klinge *et al.*, 2002; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003).

Clinicamente, as doenças peri-implantares podem ser divididas em duas categorias: mucosite e peri-implantite (Mombelli e Lang 1998, Heydenrijk et al. 2002). A mucosite peri-implantar é restrita aos tecidos moles (perda óssea <

2mm, com sangramento à sondagem e / ou supuração), e por isso é reversível; por outro lado, a peri-implantite é um processo, na grande maioria das vezes, irreversível e afeta os tecidos moles e o tecido ósseo adjacentes ao implante dentário em questão, evidenciando a perda óssea  $\geq 3$ mm radiográfica e sangramento à sondagem e/ou supuração, sendo semelhante à periodontite em dentes naturais (Lang; Berglundh, 2011). Ao primeiro sinal da perda óssea, seja através de exame radiográfico ou exame clínico com a presença de bolsa peri-implantar, existe o risco iminente de falha da terapia reabilitadora.

Atieh et al. (2013) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise incluindo nove estudos com 1.497 pacientes e 6.283 implantes e o resultado demonstram a ocorrência da mucosite peri-implantar foi estimada em 30,7% do total de implantes, enquanto que a frequência de acometimento por peri-implantite ficou em torno de 10% dos implantes avaliados pelos estudos.

Com relação ao biofilme, estudos relatam semelhanças entre a microbiota encontrada em bolsas periodontais e peri-implantares. Bactérias tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* são encontradas em ambas as situações. O biofilme uma vez instalado, tem na região das bolsas um ambiente anaeróbio, rico em peptídeos e proteínas, propiciando um aumento da complexidade da comunidade microbiana. A acumulação do biofilme dá início ao processo inflamatório do tecido gengival e/ou peri-implantar, e a presença da *Porphyromonas gingivalis* neste biofilme pode induzir à uma alteração na resposta do hospedeiro, levando à perda óssea. Na fase inicial da doença e com pequena perda óssea tenta-se uma ação mecânica associada à antibioticoterapia contra bactérias Gram-positivas e principalmente contra as bactérias Gram-negativas que estão presentes em maior quantidade. Por outro lado, pouco tem sido estudado com relação aos eventos imunológicos da peri-implantite, comparados aos tecidos peri-implantares saudáveis, ou mesmo em relação à sítios com doenças periodontais. Porém, sabe-se que a destruição tecidual é decorrente da resposta inflamatória frente a liberação e produção de enzimas proteolíticas, toxinas, LPS devido ao acúmulo de biofilme, levando à estimulação da resposta imune e das

citocinas liberadas por linfócitos e macrófagos que ativam uma ou mais vias de degradação. Durante o início da resposta inflamatória no tecido conjuntivo peri-implantar, a prostaglandina E2 (PGE2) e as citocinas interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) são liberados juntamente com várias enzimas como a metaloproteinase de matriz (MMP)-8, MMP-9 e MMP-13 (Sorsa et al., 1999). Estas MMPs são produzidas por polimorfonucleares (PMNs) e osteoclastos, promovendo a degradação do tecido conjuntivo e do tecido ósseo peri-implantar.

Recentemente Albrektsson et al. (2014) sugeriram que relacionar a perda óssea progressiva peri-implantar ao acúmulo de biofilme seria um equívoco, uma vez que esta perda óssea seria desencadeada devido à uma reação de corpo estranho ao implante. Esta hipótese tem sido amparada por estudos que demonstraram que a presença da reação a um corpo estranho seria um importante co-fator no desencadeamento da resposta inflamatória, frente às infecções bacterianas. Ainda, segundo os autores (Albrektsson et al., 2014), o imuno-complexo é dependente de uma reação de proteínas que fazem parte da resposta do sistema imunológico que reconhece corpos estranhos introduzidos no organismo. Desta forma, tem sido sugerido que a injúria tecidual causada pela perfuração do tecido ósseo provocaria a infiltração de células inflamatórias, o que resultaria no desencadeamento de uma inflamação crônica de pequena magnitude. Embora imperceptível clinicamente, esta reação promoveria a adesão de monócitos e macrófagos, seguidos pela diferenciação e fusão de macrófagos, formando então as células gigantes, características das reações de corpo estranho. No entanto, quando a reabsorção óssea atinge a crista óssea ao redor de um implante, esta inflamação passaria a apresentar sinais clínicos e, eventualmente, poderia ser ainda mais comprometida pelo acúmulo de biofilme, levando, conseqüentemente, à perda do implante (Anderson et al., 2008; Hulander et al., 2011; Donath et al., 1991). Além disso, o titânio, que é um metal considerado química e biologicamente inerte quando em contato com o tecido ósseo, e que tem sido extensamente estudado desde da descoberta da osseointegração, tem sido alvo de recentes discussões acerca da hipótese de

que toda partícula estranha ao organismo seria imediatamente reconhecida pelo sistema imune e uma cascata de reações induziria a modulação da inflamação, na tentativa de reparar o dano sofrido pelo organismo. Com isso, segundo esses autores, a osseointegração também deveria ser entendido como um processo inflamatório imuno-modulado, no qual o sistema imunitário regularia localmente de forma positiva ou negativa, o processo de reparação (Trindade et al., 2014).

A reação de corpo estranho é descrita na literatura como uma sequência prolongada de um processo inflamatório bastante complexo e dinâmico, resultante das reações imunológicas induzidas pela ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos frente à presença de um biomaterial ou qualquer outro tipo de substância estranha ao organismo, em resposta ao tamanho de suas partículas ou ainda pelas características de sua superfície. Esse tipo de reação tem por objetivo reduzir os estímulos nocivos ao organismo e iniciar o processo de reparação, por meio da formação de uma cápsula fibrosa em torno do biomaterial (Bartsch et al., 2009; Higgins et al., 2009). Todos estes eventos são acompanhados por processos apoptóticos necessários para remover o tecido lesionado e inflamado e apoiar os mecanismos de reparo.

Neste tipo de reação a ativação de macrófagos e a formação das células multinucleadas gigantes (CMG) são fundamentais para ocorrência da reação de corpo estranho (Chen et al., 2005, MacLauchlan et al., 2009). A ativação de macrófagos pode acontecer, basicamente, por duas vias. A via clássica mediada por macrófagos do tipo M1, que são responsáveis pela propagação da resposta pró-inflamatória por meio da produção de citocinas tais como a IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  e proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) e IL-6. E a outra via, é representada pelos macrófagos do tipo M2 que podem surgir quando o tecido é exposto à citocinas, tais como IL-4 e imunocomplexos. Esses macrófagos M2 são responsáveis pela produção, entre outros, de IL-10, quimiocinas como as CCL18 e CCL22, fatores esses, que estimulam a produção de fatores de crescimento que favorecem a angiogênese e produção de matriz extracelular, contribuindo para o processo de reparo (Grotenhuis et al. 2013). Luttikhuisen et al. (2006) mostraram em seu estudo que algumas quimiocinas

estão fortemente relacionadas à reação de corpo estranho, entre elas o MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MIP-1a, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) e IL-8, sendo o RANTES e o MIP-1a os mais potentes fatores quimiotáticos de macrófagos, que seriam inibidos pelo TGF- $\beta$ , no caso de resolução da reação de corpo estranho pela degradação total do material.

Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico se aderem às superfícies de biomaterial revestidos por proteínas e podem se fundir formando as células multinucleadas gigantes. Além disto, experimentos *in vitro* também mostraram que a presença de IL-4 e IL-13 pode induzir a formação das CMG que apresentam morfologia muito semelhantes às encontradas em biomateriais (Rodriguez et al., 2008). Alguns autores demonstraram que a fusão celular de macrófagos (*in vitro*) e formação das CMG (*in vivo*) ocorre na presença de maiores níveis da metaloproteinase-9 (MacLauchlan et al., 2009). As metaloproteinases constituem uma família de endopeptidases com uma grande variedade de substratos, incluindo as proteínas da matriz extracelular, alguns fatores de crescimento, quimiocinas e proteínas da superfície celular (MacLauchlan et al. 2009). A função das metaloproteinases é executar funções bastante críticas em muitos processos fisiológicos e patológicos, tais como a cicatrização de feridas, angiogênese e inflamação, regulando a invasão, migração, proliferação e apoptose celular. Mais especificamente, a MMP-9 tem sido ela caracterizada por sua capacidade de processamento de componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, principalmente tipos I, V, XI, elastina e fibronectina (Mott et al., 2004). Além disso, a MMP-9 participa do processo de ativação de diversas citocinas e fatores de crescimento tais como a IL-1, MCP-3, IL-8 e TGF- $\beta$ , além de contribuir para a destruição do tecido ósseo, aumentando a atividade osteoclásticas. (MacLauchlan et al. 2009).

Diante do exposto acima, faz-se pertinente a realização de novos estudos que avaliem a presença de fatores relacionados ao desencadeamento da reação de corpo estranho em amostras de tecido acometido por peri-implantite.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica de fatores ligados à reação de corpo estranho, IL-4, MIP-1 $\alpha$  e MMP-9, nos tecidos peri-implantares com ou sem peri-implantite.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 População de estudo**

Foram incluídos no estudo um total de 35 pacientes (16 pertencentes ao sexo feminino e 18 ao sexo masculino) que se apresentaram para tratamento com implantes dentários na Clínica de Especialização em Implantodontia da Universidade Guarulhos (UNG) entre fevereiro de 2009 e março de 2013. Para inclusão no estudo, os pacientes deveriam apresentar os seguintes critérios: ausência de lesões na cavidade bucal; boa higiene oral; boas condições de saúde; pelo menos 1 implante instalado na cavidade bucal a ser realizada cirurgia de reabertura para colocação de um cicatrizador (Grupo Saúde); e apresentar um implante com indicação de tratamento cirúrgico para a peri-implantite (Grupo Peri-Implantite).

Os critérios de exclusão do estudos foram estabelecidos conforme descritos a seguir: fumantes, pacientes com consumo excessivo de álcool, em tratamento quimio ou radioterápico, presença de doenças sistêmicas como doenças hepáticas, discrasias sanguíneas, doenças renais, diabetes, qualquer condição autoimune, imunodeprimidos, uso crônico de corticosteroides ou outras drogas que possam influenciar no metabolismo ósseo, gestantes, lactantes ou que façam uso crônico de enxaguatórios bucais.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Guarulhos e os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

#### **3.2 Desenho experimental**

Para o Grupo Peri-Implantite (n=20) foram obtidas amostras do tecido peri-implantar de cada paciente submetido ao tratamento cirúrgico da peri-implantite avançada. Esses implantes deveriam apresentar perda óssea maior que 4mm, sangramento à sondagem e/ou supuração e comprometimento de 2/3 do suporte ósseo).

Para o Grupo Saúde (n=15) as amostras de tecido foram obtidas de

pacientes submetidos a reabertura de implantes dentais, 90 dias após a instalação dos mesmos.

Caso um único paciente apresentasse implantes para inclusão em ambos os grupos, foi incluído apenas o de pior diagnóstico. Caso 2 ou mais implantes apresentassem diagnóstico similar, apenas o de posição mais anterior foi incluído no estudo.

### **3.3 Avaliação da expressão Gênica.**

#### **3.3.1. Extração do RNA**

As amostras de tecido peri-implantar foram coletadas e imediatamente acondicionadas em uma solução de RNAlater® (Ambion Inc., Austin, TX, EUA), para evitar a degradação do RNA. As amostras permaneceram incubadas a 4°C, durante 24 horas e em seguida foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do RNA. Primeiramente, a solução de RNA later foi aspirada e o tecido foi imerso em nitrogênio líquido para trituração. A amostra triturada foi, então, transferida para um tubo contendo 1mL de TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), homogeneizada durante 30 segundos e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 200uL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, EUA) às amostras, e estas foram agitadas em vortex e centrifugadas a 11500 RPM por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. A porção aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado isopropanol, sendo agitado em vortex, incubado por 20 minutos a temperatura ambiente e centrifugado da mesma forma descrita acima. As amostras de RNA foram subsequentemente ressuspendidas em 20 µL, de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração de RNA foi determinada por meio de um espectrofotômetro. Em seguida, 1 µg do RNA total foi avaliado quanto a sua qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

#### **3.3.2 Tratamento com DNase**

As amostras de RNA total foram tratadas para a eliminação de qualquer

resíduo de DNA com DNase (DNA-free™, Ambion Inc., Austin, TX, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Nos tubos contendo o RNA total extraído foram adicionadas a solução tampão e a DNase turbo, baseado na concentração de RNA previamente avaliada. Após agitação e centrifugação, as amostras permaneceram incubadas em 37°C durante 30 minutos. Finalmente, foi acrescentado o inativador de DNase e a solução foi agitada e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o RNA total foi novamente quantificado por meio do uso de um espectrofotômetro.

### 3.3.3 Transcrição reversa

Um total de 1 µg da amostra de RNA total livre de DNA foi utilizado para a síntese do cDNA. As reações foram realizadas para o volume final de 30 µL utilizando o kit First-Strand cDNA Synthesis (Roche Diagnostic Co., Indianápolis, IN, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos em 25°C e, seguido por 60 minutos em temperatura de 42°C. Em sequência, as amostras foram incubadas por 5 minutos em 95°C e então por 5 minutos em 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl<sub>2</sub> (5mM), desoxinucleotídeos (1mM), primers randomizados (3,2µg), inibidor de RNase (50U) e transcriptase reversa AMV (20U).

### 3.3.4 Análise da expressão gênica por Real-time PCR (RT-PCR)

#### 3.3.4.1 Desenho dos Primers

Os primers para GAPDH (glycerin-aldehyd-3-phosphat- dehydrogenase (gene de referência) e para interleucina-4 (IL-4), proteína inflamatória de macrófago - 1 alfa (MIP-1α), metaloproteinase 9 (MMP-9) foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para elaboração de *primers* para o LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Todos os *primers* foram verificados quanto a sua especificidade por meio da análise da curva de Melting utilizando-se sempre de controle positivo e negativo. Na tabela 1 podem ser observadas a sequência dos *primers*, o perfil

das reações e a tamanho dos amplicons gerados durante as reações.

**Tabela 1.** Sequência de *primers*, perfil de amplificação e tamanho estimado do amplicon.

Genes	Sequencia (5'- 3')	Perfil de amplificação temp (°C) /tempo (s)	Tamanho do amplicon (pb)
IL-4	F: 5' CCTCACATTGTCACTGCAAATC 3' R: 5' CTTCTGCTCTGTGAGGC 3'	95/10, 57/7, 72/7	168
MMP-9	F: 5' GCTACCACCTCGAACTTTGAC 3' R: 5' CTCAGTGAAGCGGTACATAGG 3'	95/10, 57/7, 72/7	248
MIP-1α	F: 5' GGAGTGGGTCCAGAAATATGTC 3' R: 5' CTGTTTGGCAACAACCAGTC 3'	95/10, 57/7, 72/7	175
GAPDH	F: 5' CTGAGTACGTCGTGGAGTC 3' R: 5' TGATGATCTTGAGGCTGTTGTC 3'	95/10, 56/5, 72/7	187

IL-4 = interleucina 4; MMP-9 = metaloproteinase 9; MIP-1α = proteína inflamatória de macrófago 1 alfa; GAPDH = glicerin-aldehid-3-phosphate-dehydrogenase.

#### 3.3.4.2 Otimização das reações

A eficiência das reações para cada gene foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2,5 a 5 M de cada par de *primers* foram utilizadas para se determinar em quais condições a reação apresentava a melhor eficiência, conforme sugestões do fabricante do equipamento. A concentração ótima estabelecida para as reações foi de 5 μM.

#### 3.3.4.3 Reações de RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), utilizando o kit *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). O perfil das reações foi determinado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das análises, a água DEPC foi

utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH). Os níveis de expressão do gene GAPDH foram utilizados como referência (*housekeeping*) para a normalização dos valores.

### **3.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo programa Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Inicialmente, os dados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov. As diferenças na frequência dos gêneros foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. A idade dos indivíduos incluídos no estudo foi apresentada como média e desvio padrão da média e avaliada pelo teste t de Student. Com relação aos dados referentes a análise da expressão gênica, como foi detectada ausência de normalidade dos valores, estes foram analisados utilizando um método estatístico não paramétricos (Mann Whitney). Os resultados foram expressos em mediana e valores mínimo e máximo. O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ) para todas as análises realizadas.

## 4 RESULTADOS

Todos os indivíduos incluídos no estudo apresentaram boa condição periodontal nos demais dentes presentes na cavidade bucal, respeitando os critérios de inclusão e exclusão do estudo.

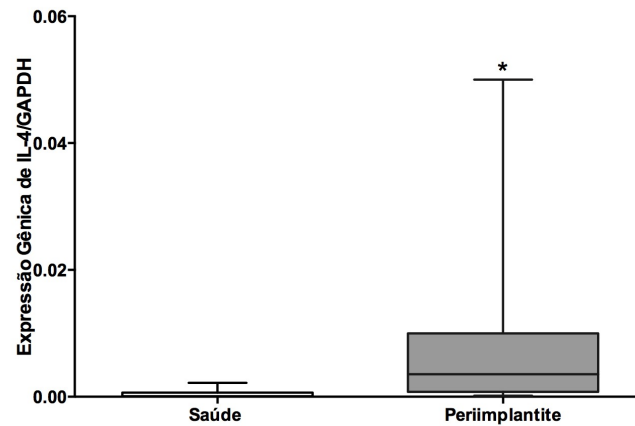
A distribuição demográfica de ambos os grupos foram inseridos na tabela 2. Não foram detectadas diferenças significativas com relação à idade e distribuição de gêneros para os diferentes grupos do estudo ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 2.** Características demográficas da amostra para ambos os grupos.

	<b>GRUPO SAÚDE</b> n=15	<b>GRUPO PERI-IMPLANTITE</b> n=20
<b>GÊNERO</b>		
<b>Feminino</b>	7	9
<b>Masculino</b>	8	11
<b>IDADE</b>	49.4 ± 5.2	48.6 ± 5.5

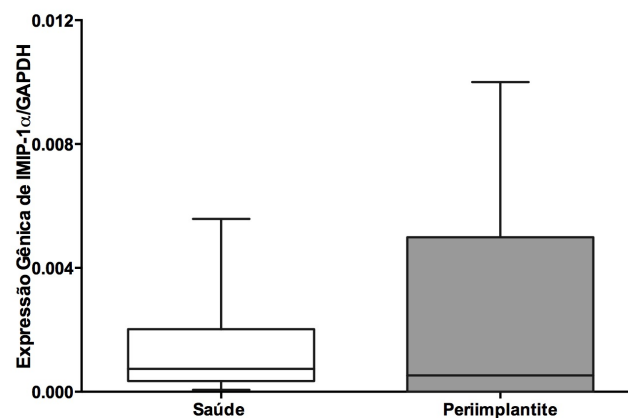
Inicialmente foram obtidas um total de 35 amostras divididas entre os dois grupos experimentais (Grupo Controle: n=15 e Grupo Peri-Implantite: n=20). Após os processos de extração de RNA foi excluída uma amostras pertencente ao Grupo Peri-Implantite, uma vez que esta não apresentou a qualidade necessária para prosseguir as análises, detectada pela ausência de expressão do gene de referência (GAPDH). Com isso as análises dos genes alvo por RT-PCR totalizaram 15 amostras para o Grupo Controle e 19 amostras para o Grupo Peri-Implantite.

Os resultados relativos à expressão do gene da IL-4 apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação dos diferentes grupos do estudo, com maiores níveis de expressão desta citocina no grupo de pacientes com peri-implantite quando comparado aos saudáveis ( $p < 0,0001$ ), como ilustrado na figura 1.



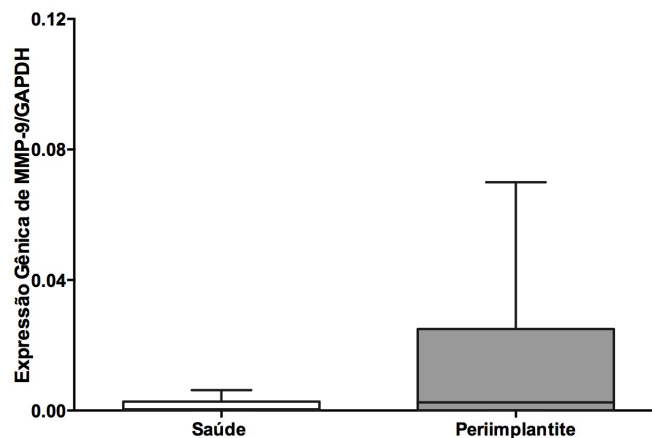
**Figura 1:** Níveis de expressão gênica de interleucina-4 em relação a expressão do gene de referência (GAPDH: glicerin-aldehíd-3-fosfat-dehidrogenase) nos tecidos peri-implantares. \* Significância estatística detectada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Em contrapartida, a comparação dos níveis de expressão gênica de MIP-1 $\alpha$  nos tecidos peri-implantares doentes aos tecidos saudáveis não apresentou diferenças significativas, conforme pode ser observado na figura 2 ( $p = 0,06$ ).



**Figura 2:** Níveis de expressão gênica de proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) em relação a expressão do gene de referência (GAPDH: glicerin-aldehíd-3-fosfat-dehidrogenase) nos tecidos peri-implantares.

Com relação à MMP-9, a comparação entre ambos os grupos do estudo apresentou resultados similares aos resultados obtidos para MIP-1 $\alpha$ , ou seja, os níveis de expressão gênica de MMP-9 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ( $p=0,2337$ ), assim como mostra a figura 3.



**Figura 3:** Níveis de expressão gênica da metaloproteinase-9 em relação a expressão do gene de referência (GAPDH: glicerin-aldehíd-3-fosfat-dehidrogenase) nos tecidos peri-implantares.



## 5 DISCUSSÃO

Poucos autores tem estudado as características da resposta imune nas lesões peri-implantares. A falta de dados que demonstrem o tipo de resposta desencadeada frente à infecção peri-implantar tem levado alguns autores a levantar diferentes hipóteses sobre a patogênese da perda óssea peri-implantar, que, até pouco tempo atrás acreditava-se ser desencadeada pelo acúmulo do biofilme na região peri-implantar.

Dada a escassez de informação a respeito das infecções peri-implantares, e à suposições de que a peri-implantite seria causada por uma reação de corpo estranho frente ao titânio, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de expressão de IL-4, MIP-1 $\alpha$  e MMP-9 na tentativa de investigar a ocorrência da reação de corpo estranho nos tecidos peri-implantares acometidos por peri-implantite e compará-los com tecidos livres de doença infecto-inflamatória.

Os resultados do presente estudo demonstraram maiores níveis de IL-4 nos tecidos com peri-implantite com relação aos sítios saudáveis. Esses resultados corroboram com os achados de Fonseca et al. (2014) que demonstraram a presença de maior concentração de IL-4 no fluido peri-implantar de sítios profundos, quando comparados aos sítios rasos e sítios que não apresentaram perda de inserção óssea. A IL-4 é uma citocina representante da família de resposta Th2, responsável pela resolução da inflamação. Os macrófagos são células que desempenham um papel importante na inflamação crônica e reparação de tecidual. A presença de IL-4 nos tecidos promove a ativação de macrófagos da via alternativa (M2) e inibe a ativação da via clássica (M1), ou seja, o aumento nos macrófagos de reparação (M2) é acoplado com a secreção de IL-10 e TGF- $\beta$  que resultam na resolução da inflamação patológica. De acordo com Dennison e Van Dyke (1997) em lesões periodontais, o aumento da produção de IL-4 inibiria a ativação de macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias.

A MMP-9 tem sido descrita como um modulador essencial durante

desenvolvimento de uma reação de corpo estranho. MacLauchlan et al. (2009) demonstraram em seu estudo que a MMP-9 além de desempenhar um papel importante durante a remodelação óssea e angiogênese, regula o processo de fusão de macrófagos, apresentando uma participação fundamental na função das células gigantes características da reação de corpo estranho. Porém, os resultados do presente estudo não demonstraram diferença estatística na expressão gênica de MMP-9 quando comparados tecidos de sítios com e sem peri-implantite, contrariando os estudos de Trindade et al. (2014) e Albrektson et al. (2014) que consideram a perda óssea marginal ao redor dos implantes um desequilíbrio de uma reação de corpo estranho frente ao dispositivo de titânio. Esses autores afirmam que frente à inserção de um implante existam dois tipos de resposta do hospedeiro: o desenvolvimento de uma reação de corpo estranho, caracterizada por uma resposta inflamatória crônica, na qual o implante é isolado do resto do organismo pela formação de uma camada de tecido ósseo bastante condensada, ou ainda, a resposta de corpo estranho ao implante resultaria no encapsulamento fibroso do mesmo, representando, então, uma falha clínica primária. Ainda neste estudo, os autores ignoram o componente microbiano como possível fator etiológico das doenças peri-implantares, baseando-se no estudo de Donath et al. (1992). No entanto, no estudo em que este autor relacionou a reação de corpo estranho frente a implantes, este não se referiu aos implantes de titânio, um metal biocompatível e bioinerte. Donath et al. (1992) em seu estudo avaliou tecidos orais de encapsulamento de amálgama, materiais para preenchimento endodôntico e algumas cerâmicas de fosfato de cálcio. Claramente, os autores mostraram em seu estudo a predominância da presença de células gigantes, no tecido analisado, diferentemente do apresentado nos resultados deste estudo em que não há evidencia da presença de células gigantes nas biopsias de tecido peri-implantar, não caracterizando a reação de corpo estranho. Além disso, os dados de Fonseca et al. (2014) também corroboram com os resultados do presente estudo, uma vez que não foi observada diferença nas concentrações de IL-8, um potente quimiotático produzido por macrófagos, que também exerce um papel

importante durante a reação de corpo estranho (Luttikhuisen et al., 2007), no fluido peri-implantar de sítios com e sem perda óssea.

Os resultados do presente estudo também não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à expressão gênica de MIP-1 $\alpha$  nos tecidos peri-implantares com e sem peri-implantite. Esses resultados contrariam os achados de Petkovic et al. (2010) que avaliaram fluido peri-implantar de sítios saudáveis, com mucosite inicial e mucosite avançada e observaram que os sítios saudáveis apresentaram menores concentrações de MIP-1 $\alpha$  que os sítios acometidos pela mucosite.

## 6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, foi possível concluir que a expressão gênica de IL-4 encontra-se aumentada em tecidos peri-implantares retirados de sítios acometidos pela peri-implantite em comparação aos tecidos saudáveis, porém nenhuma diferença foi observada comparando-se os níveis de expressão de MIP-1 $\alpha$  e MMP-9, importantes moduladores da resposta de corpo de estranho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Dahlin C, Jemt T, Sennerby L, Turri A, Wennerberg A. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014; 16:155-65.

Anderson JM, Jones JA. Phenotypic dichotomies in the foreign body reaction. *Biomaterials.* 2007; 28:5114-20.

Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008; 20:86–100.

Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ (2013) The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2013; 84:1586-98.

Bartsch I, Willbold E, Yarmolenko S, Witte F. In vivo fluorescence imaging of apoptosis during foreign body response. *Biomaterials.* 2012; 33:6926-32.

Chang DT, Colton E, Anderson JM. Paracrine and juxtacrine lymphocyte enhancement of adherent macrophage and foreign body giant cell activation. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 89:490-8.

Chen, E. H., Olson, E. N. Unveiling the mechanisms of cell–cell fusion. *Science.* 2005; 308:369–73.

Donath K, Laass M, Günzl HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(2):131-7.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to

failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:527-51.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106:721-64.

Fonseca FJPO, Moraes Junior M, Lourenc\_o EJV, Teles DM, Figueredo CM. Cytokines expression in saliva and peri- implant crevicular fluid of patients with peri-implant disease. *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, e68–e72

Grotenhuis N, Bayon Y, Lange JF, Van Osch GJ, Bastiaansen-Jenniskens YM. A culture model to analyze the acute biomaterial-dependent reaction of human primary macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 29;433:115-20.

Heydenrijk K, Meijer HJA, van der Reijden WA, Raghoobar GM, Vissink A, Stegenga B. Microbiota Around Root-Form Endosseous Implants: A Review of the Literature. *International J Oral Maxillofac Impl.* 2002; 17: 829–38.

Higgins DM, Basaraba RJ, Hohnbaum AC, Lee EJ, Grainger DW, Gonzalez-Juarrero M. Localized immunosuppressive environment in the foreign body response to implanted biomaterials. *Am J Pathol* 2009;175:161-70.

Hulander M, Lundgren A, Berglin M, Ohrlander M, Lausmaa J, Elwing H. Immune complement activation is attenuated by surface nanotopography. *Int J Nanomedicine* 2011; 6:2653–66.

Jones JA, Chang DT, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, Anderson JM. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Dec 1;83(3):585-96.

Jones JA, McNally AK, Chang DT, Qin LA, Meyerson H, Colton E, Kwon IL, Matsuda T, Anderson JM. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jan;84(1):158-66.

Kivelä-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, Salo T, Sorsa T. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontol Res*. 2003;38:583-90.

Klinge B, Gustafsson A, Berglundh T. A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29:213-25.

Lang NP, Berglundh T, & Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; 38: 178–81.

Li Y, Schutte RJ, Abu-Shakra A, Reichert WM. Protein array method for assessing in vitro biomaterial-induced cytokine expression. *Biomaterials*. 2005; 26:1081-5.

Luttikhuisen DT, Dankers PY, Harmsen MC, van Luyn MJ. Material dependent differences in inflammatory gene expression by giant cells during the foreign body reaction. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83:879-86.

MacLauchlan S, Skokos EA, Mezmarich N, Zhu DH, Raouf S, Shipley JM, Senior RM, Bornstein P, Kyriakides TR. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *J. Leukoc. Biol*. 2009;

85: 617–26.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of periimplantitis. *Periodon* 2000. 1998; 17: 63–76.

Mombelli A. Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. eds. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Workshop on Periodontology*. Berlin: Quintessence Book. 1999; 281-303.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16:558–64.

Petkovic AB, Matic SM, Stamatovic NV, Vojvodic DV, Todorovic TM, Lazic ZR, Kozomara RJ. Proinflammatory cytokines (IL-1b and TNF-a) and chemokines (IL-8 and MIP-1a) as markers of peri-implant tissue condition. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010; 39: 478–485.

Rodriguez A, Meyerson H, Anderson JM. Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A. J Biomed Mater Res A.* 2009; 89:152-9.

Sorsa T, Mäntylä P, Rönkä H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, Kinane DF, Salo T, Golub LM, Teronen O, Tikanoja S. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 30:878:130-40.

Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014 Sep 25. [Epub ahead of print]

van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative



impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. Clin Oral Implants Res. 2002;13:617-22.