



CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA

**DANILO JORGE RACY**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-10 E IL-21,  
CITOCINAS LIGADAS À RESPOSTA IMUNE TH2 E TH17, EM  
INDIVÍDUOS COM E SEM PERI-IMPLANTITE.**

Guarulhos

2015

**DANILO JORGE RACY**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-10 E IL-21,  
CITOCINAS LIGADAS À RESPOSTA IMUNE TH2 E TH17, EM  
INDIVÍDUOS COM E SEM PERI-IMPLANTITE.**

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

Área de Concentração: Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Jamil Awad Shibli

Co-orientador: Profa. Dra. Gabriela Giro Araujo

Guarulhos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

R118a

Racy, Danilo Jorge

Avaliação da expressão gênica de il-10 e il-21, citocinas ligadas à resposta imune th2 e th17, em indivíduos com e sem peri-implantite. / Danilo Jorge Racy. -- 2015.

25 f.; 31 cm.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jamil Awad Shibli

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

1. Implantes dentários 2. Peri-implantite 3. Fatores de transcrição 4. IL-10 5. IL-21 6. Células T regulatórias 7. Células Th17 8. Expressão Gênica 9. PCR em tempo real. I. Título II. Shibli, Jamil Awad (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

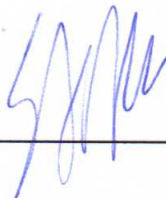
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-10 E IL-21, CITOCINAS LIGADAS À RESPOSTA IMUNE TH2 E TH17, EM INDIVÍDUOS COM E SEM PERI-IMPLANTITE” em sessão pública realizada em 23 de março de 2015, considerou o candidato DANILO JORGE RACY aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

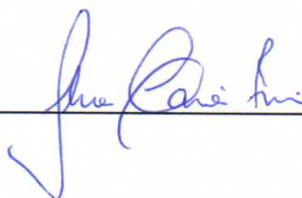
1. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG)



2. Prof. Dr. Sérgio Alexandre Gehrke (UCU)



3. Profa. Dra. Alessandra Cassoni Ferreira (UnG)



Guarulhos, 23 de março de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, que me deu saúde e força para encarar os desafios necessários a minha evolução espiritual, e me deu uma família maravilhosa e amigos sinceros, nos quais posso me amparar nos meus momentos de fraqueza.

Luiza e Laura Racy, sem sua presença e seu amor tudo seria infinitamente mais difícil.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Jamil Awad Shibli pela eficiência e seriedade e conhecimento que me conduziram para realização deste trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gabriela Giro Araújo, minha co-orientadora, pelo profissionalismo e competência com que conduz sua jornada de trabalho.

Aos docentes de Mestrado em Implantodontia pela sabedoria demonstrada na transmissão dos conhecimentos: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Magda Feres, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra C. Ferreira, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof. Dr. Marcelo de Faveri, Prof. Dr. André Figueiredo Reis, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Poliana Duarte, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marta F. Bastos e Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gabriela Giro Araujo

## RESUMO

A peri-implantite consiste de um processo inflamatório crônico que, além dos tecidos moles, afeta também o osso circunjacente ao implante, e é responsável pela massiva perda óssea que leva a perda do implante. Embora a peri-implantite seja causada pelo biofilme bacteriano e que se saiba que mecanismos imuno-inflamatórios estão relacionados com a progressão da doença, poucos estudos tem avaliado o comportamento das diferentes subpopulações de células T *helper* ( $T_H$ ) nas lesões peri-implantares. A ativação da resposta imune adaptativa foi originalmente descrita como mediada por duas subpopulações efetoras de células  $T_H$ :  $T_H1$  e  $T_H2$ . Este paradigma, foi modificado após a caracterização de células  $T_H17$  e T regulatórias ( $T_{reg}$ ), responsáveis pela produção da IL-17/IL-21 e IL-10/TGF- $\beta$ , respectivamente. Embora o envolvimento destas subpopulações de células  $T_H$  tenham sido analisadas na periodontite crônica, nenhum estudo avaliou a expressão dos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação em  $T_H17$  e  $T_{reg}$  na peri-implantite. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de expressão gênica de IL-10 e IL-21 em tecidos peri-implantares com e sem peri-implantite. Trinta e cinco indivíduos (15 saudáveis e 20 com peri-implantite) foram incluídos neste estudo seguindo os critérios de inclusão e exclusão. 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  $\geq 3$  mm. Biópsias de tecidos peri - implantar foram coletadas para análise dos níveis de expressão do mRNA do IL-10 e IL-21. 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. Foram detectados maiores níveis de expressão para ambos os genes avaliados nos tecidos acometidos por peri-implantite quando comparada aos indivíduos saudáveis.

**PALAVRAS-CHAVES:** Implantes dentários. Peri-implantite. Fatores de transcrição. IL-10, IL-21, Células T regulatórias, Células Th17. Expressão Gênica. PCR em tempo real.

## ABSTRACT

Peri-implantitis is characterized as a chronic inflammatory process that affects not only soft tissues but bone adjacent to the implant, and is responsible for the massive bone loss that lead to implant loss. Although peri-implantitis was caused by bacterial biofilm and is well know that in a that immuno-inflammatory mechanisms are related with the diseases progression, few studies have evaluated the behaviour different subpopulations of T *helper* (T<sub>H</sub>) cells on peri-implantitis lesions. The activation of adaptive immune response was original described as mediate by two subpopulations of T<sub>H</sub> cells: T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2. This paradigm was modified follow characterization of T<sub>H</sub>17 and T regulatory (T<sub>reg</sub>), responsible by production of IL-17/IL-21 and IL-10/TGF- $\beta$ , respectively. Even though the participation of these T<sub>H</sub> cell subpopulations have been evaluated in periodontal diseases, any study evaluated the expression of these transcriptions factors responsible by differentiation of T<sub>H</sub>17 on T<sub>reg</sub> in peri-implant diseases. Therefore, the aim of this study was to evaluate the gene expression levels of IL-10 and IL-21 on soft tissues of healthy and diseased implants. Thirty-five subjects (15 healthy and 20 with peri-implantitis) were evaluated in this study following the inclusion and exclusion criteria's. Even that, subjects with peri-implantitis must present loss of clinical attachment and increased peri-implant probing depth bleeding on probing and marginal bone loss  $\geq 3$  mm. Biopsies were taken to analyse the levels of mRNA of IL-10 and IL-21 expression. The samples were submitted to total RNA extraction, treatment with DNase and synthesis of cDNA. Subsequently, the real time PCR reaction, were performed to evaluate the gene expression levels of the molecules. The evaluated molecules presented higher levels for both genes on soft tissues from site with peri-implantitis when compared with health subjects.

**KEYWORDS:** Dental Implants. Peri-implantitis. IL-10, IL-21, T Cells, Th17 cells. Gene expression. Real time PCR.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>22</b>

## 1. INTRODUÇÃO

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. E 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).

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- $\alpha$ ) e as interleucinas (IL)- 1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 e 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).

A capacidade que um hospedeiro possui para se defender de processos infecciosos é dado pela resposta imunológica. Esta pode ser classificada em dois tipos: inata e adaptativa. A resposta imune inata atua reconhecendo rapidamente os invasores e respondendo a estes. A resposta imune adaptativa, envolve os linfócitos T e B, que reconhecem antígenos e elaboram uma resposta de defesa na qual a especificidade e a memória são características chave (Modlin; Brener, 2008). Células T são linfócitos que desempenham um papel fundamental na imunidade mediada por células, sendo divididas em diferentes sub-populações dependendo de sua função. Dentro do contexto do presente estudo, se destacam as células T auxiliares ( $T_H$ ), responsáveis pela resposta imune adaptativa contra patógenos via liberação de citocinas, que regulam todas as atividades de defesa e entre elas também o processo inflamatório. A presença de determinadas citocinas produzidas no ambiente em que ocorre a apresentação do antígeno à célula  $T_H$ , induz a diferenciação destas células em diferentes sub-populações caracterizadas pela atividade de diferentes fatores de transcrição que conseqüentemente estimulam a síntese e secreção de diferentes tipos de citocinas. São descritas atualmente sete diferentes sub-populações de células  $T_H$ :  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H9$ ,  $T_H17$ ,  $T_H22$ ,  $T_H$  folicular ( $T_{fh}$ ) e as T regulatórias ( $T_{reg}$ ) (Askar, 2014).

Os linfócitos T *helper* ( $T_H$ ) conhecidos como células T CD4+, podem se diferenciar durante o processo de ativação do sistema imune, formando

diferentes sub-populações 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 (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).

Após o processo de diferenciação das células T em uma das diferentes sub-populações, a resposta eficiente para a eliminação do antígeno poderá acontecer, assim como também poderá ocorrer uma ativação excessiva ou um desequilíbrio na função destas células, com conseqüente produção exacerbada de citocinas que pode desencadear uma excessiva resposta inflamatória (Korn et al., 2009). As sub-populações Th1 e Th17 promovem resposta inflamatória pela produção de citocinas como o Intérferon (IFN)- $\gamma$  e Interleucina (IL)-17 e IL-21, 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 (TGF- $\beta$ ). É importante ressaltar que 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*) (Cosmi et al., 2014).

Devido a influência das células T<sub>reg</sub> e T<sub>H</sub>17 no processo inflamatório na periodontite, e dada a escassez de estudos que tenham avaliado a atividades destas diferentes sub-populações de células de defesa na peri-implantite, a análise da atividade das células T<sub>reg</sub> e T<sub>H</sub>17 na doença peri-implantar é de suma importância para se compreender os mecanismos imuno-inflamatórios envolvidos na destruição dos tecidos peri-implantares

## **2. PROPOSIÇÃO**

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resposta imune promovido por células T regulatórias e Th17 em indivíduos com peri-implantite por meio da análise dos níveis de expressão gênica de IL-10 e IL-21 em tecidos com e 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 19 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 de inclusão: ausência de lesões na cavidade bucal; boa higiene oral; boas condições de, pelo menos 1 implante instalado na cavidade bucal a ser realizada cirurgia de reabertura para colocação de um cicatrizador (GRUPO Controle); 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 e qualquer condição autoimune; imunodeprimidos; uso crônico de corticoesteróides e outras drogas que possam influenciar no metabolismo ósseo; gestantes e lactantes; doenças autoimunes; uso crônico de enxaguatório bucais.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de 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 (remoção dos implantes acometidos pela doença). Esses implantes deveriam apresentar bolsas maiores que 5 mm, sangramento à sondagem e/ou supuração, mobilidade e comprometimento de 2/3 do suporte ósseo).

Para o GRUPO Controle (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**

Quando coletadas, as amostras de tecido peri-implantar foram 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  $\mu$ L, de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração de RNA foi determinada por meio de um espectrofotômetro. Em seguida, 1  $\mu$ g 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 foi adicionada 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  $\mu$ g 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  $\mu$ L 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 (3,2 $\mu$ g), 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-10 (IL-10) e interleucina-21 (IL-21) 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')	Tamanho do amplicon (pb)	Perfil de amplificação temp (°C) /tempo (s)
IL-10	F: 5' GGCGCTGTCATCGATTTCTT 3'	116	95/10, 57/7, 72/7
	R: 5' ATGGCTTTGTAGACGCCTTTC 3'		
IL-21	F: 5' ACTGTGAGTGGTCAGCTATTTTC 3'	116	95/10, 57/7, 72/7
	R: 5' AGGTGATTTCTCTTCAGCTTT 3'		
GAPDH	F: 5' CTGAGTACGTCGTGGAGTC 3'	250	95/10, 56/5, 72/7
	R: 5' TGATGATCTTGAGGCTGTTGTC 3'		

IL-10 = interleucina 10; IL-21 = interleucina 21; GAPDH = glicerin-aldehid-3-phosphate-dehidrogenase.

#### 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 M.

#### 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 paramétrico (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.

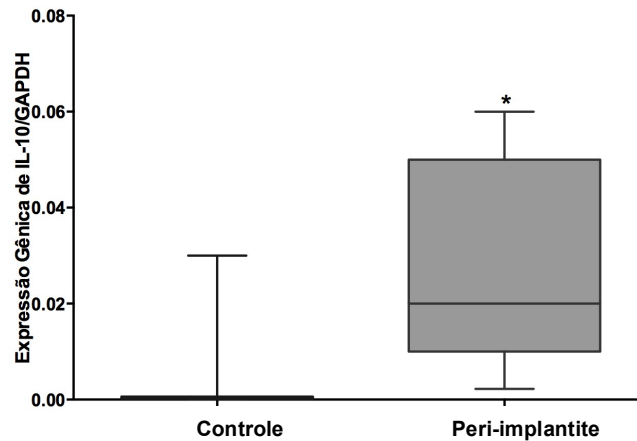
A distribuição demográfica de ambos os grupos foi inserida na tabela 2. Não foram detectadas diferenças significativas com relação à idade e distribuição de gêneros para os diferentes grupos do estudo ( $p > 0.05$ ).

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

	<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>GRUPO PERI-IMPLANTITE</b>
	<b>n=15</b>	<b>n=20</b>
<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 amostra 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.

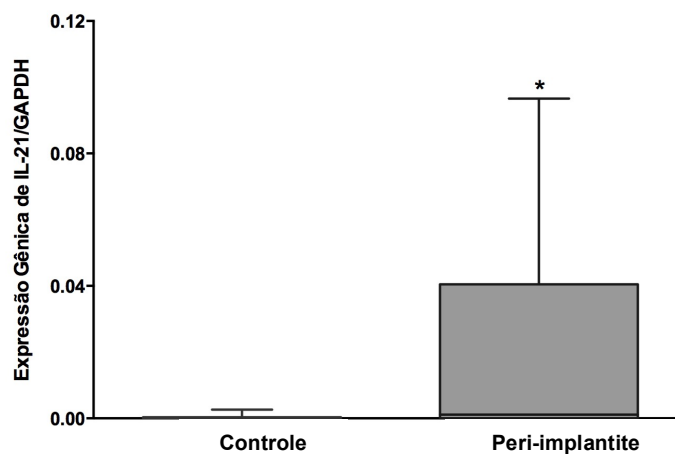
Os resultados relativos à expressão do gene da IL-10 apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação dos diferentes grupos do estudo, com maiores níveis de expressão desta citocina no grupo de pacientes com peri-implantite quando comparado ao Grupo Controle ( $p < 0,0001$ ), como ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Níveis de expressão gênica de interleucina-10 (IL-10) em relação a expressão do gene de referência (GAPDH: glicerin-aldehyd-3-phospat-dehydrogenase) nos tecidos peri-implantares.

\* Significância estatística detectada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Resultados semelhantes também foram observados para a expressão genica de Il-21, que também se apresentou em níveis elevados no Grupo Peri-implantite, em relação ao Grupo Controle.



**Figura 2:** Níveis de expressão gênica de interleucina 21 (IL-21) em relação a expressão do gene de referência (GAPDH: glicerin-aldehyd-3-phospat-dehydrogenase) nos tecidos peri-implantares.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado a diferenciação de células  $T_H$  nas subpopulações  $T_{H17}$  e  $T_{reg}$  na peri-implantite, por meio da avaliação da expressão gênica das interleucinas 10 e 21. Os resultados mostraram níveis aumentados de expressão do mRNA codificante para IL-10 e IL-21 nos tecidos peri-implantares doentes quando comparado aos tecidos saudáveis.

Os linfócitos  $TCD4^+$  ou  $T_H$  possuem participação central na resposta de defesa do hospedeiro contra diversos tipos de patógenos. Tem sido demonstrado que as células  $T_H$  se dividem em diferentes subpopulações de células efetoras, e estudos direcionados a estas células podem permitir o desenvolvimento de processos que impediriam o curso natural de várias doenças associadas a resposta imunológica, por bloquear os sinais que direcionam a formação dos diferentes fenótipos de células  $T_H$ , como no caso da resposta inflamatória crônica (Cosmi et al., 2014). Neste contexto, células  $T_H$  do tipo  $T_{H1}$  e  $T_{H17}$  tem sido associadas com desordens inflamatórias crônicas, enquanto que a subpopulação  $T_{reg}$  atua regulando a atividade das outras subpopulações (Chaudhry et al., 2009).

Tem sido sugerido que um desequilíbrio entre as diferentes subpopulações de células  $T_H$  está associado à progressão da doença periodontal (Seymour; Gemmel, 2001, Ukai et al.; 2001; Teng, 2002; Garlet et al., 2003). Embora níveis aumentados de algumas citocinas pro-inflamatórias tenham sido detectados em sítios com peri-implantite (Kontinnen et al., 2006; Venza et al., 2010), poucos estudos focaram na caracterização da atividade de células  $T_{H17}$  e  $T_{reg}$  nos tecidos peri-implantares saudáveis e doentes (Severino et al., 2011; Darabi et al., 2013; Recker et al., 2015).

Darabi et al., 2013 demonstraram níveis aumentados de IL-17 no fluido peri-implantar de indivíduos com peri-implantite avaliados por ELISA. Mais recentemente, resultados similares foram demonstrados por Recker et al. (2015) utilizando análises por multiplex. Severino et al. (2011) avaliaram os níveis de expressão gênica de IL-17 e IL-10, genes respectivamente

envolvidos com perfil  $T_H17$  e  $T_{reg}$  de resposta, por PCR em Tempo Real. Os autores demonstraram uma maior expressão de IL-17 em indivíduos com peri-implantite e não detectaram diferenças significativas para os níveis de expressão da IL-10. De uma forma geral, os resultados dos estudos acima citados sugerem um predomínio de  $T_H17$  em tecidos com peri-implantite quando comparado aos saudáveis, dados estes suportados pelos estudos que demonstram que as citocinas associadas ao perfil  $T_H17$  exacerbam a resposta inflamatória e a osteoclastogênese (Oda et al., 2003, Takahashi et al., 2005, Sato, 2006, Beklen et al., 2007). Desta forma, níveis aumentados de IL-10 nos tecidos peri-implantares doentes detectados no presente estudo, estão em acordo com os descritos anteriormente.

Alguns estudos que avaliaram a participação das citocinas características da subpopulação de células  $T_{reg}$ , tais como o TGF- $\beta$  e a IL-10 no fluido peri-implantar (Araujo et al., 2014; Severino et al., 2011; Recker et al., 2015) corroboram com os do presente estudo pois, por meio da técnica de imunohistoquímica, foi mostrado um maior número de células positivas para TGF- $\beta$  e IL-17 em lesões peri-implantares quando comparado aos tecidos saudáveis. Porém, em outros estudos não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de IL-10 no fluido peri-implantar de sítios com peri-implantite (Severino et al., 2011; Recker et al., 2015). Em conjunto, estes resultados sugerem um aumento dos níveis da subpopulação de células  $T_{reg}$ , concomitante ao das células  $T_H17$ , nos tecidos com peri-implantite. Isso corrobora com os resultados do presente estudo, que sugere a presença de níveis aumentados de ambas citocinas estudadas na peri-implantite. Este fato poderia ser devido à um padrão misto de resposta e conseqüente progressão da doença. Porém, novos estudos ainda são necessários para avaliar mais claramente os diferentes tipos de citocinas envolvidas na plasticidade de células  $T_{reg}$  e  $T_H17$  para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da peri-implantite.

## 6. CONCLUSÕES

Foram observados maiores níveis de expressão gênica da Interleucina 10, bem como da interleucina 21, associados a diferenciação dos linfócitos T em  $T_H17$  e  $T_{reg}$ , respectivamente, nos tecidos acometidos por peri-implantite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adibrad M, Deyhimi P, Ganjalikhani Hakemi M, Behfarnia P, Shahabuei M, Rafiee L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2012;47(4):525-31.

Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006;27(2):110-8.

Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(4):336-46.

Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Graetz C, Dorfer CE, Wiltfang J, Hasler R. Peri-implantitis versus periodontitis: functional differences indicated by transcriptome profiling. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014;16(3):401-11.

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

Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations of human peri-implantitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2004;31(5):341-7.

Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006;108(3):804-11.

Botero JE, Gonzalez AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol.* 2005;76(9):1490-5.

Carcuac O, Abrahamsson I, Albouy JP, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(4):363-71.



Donath K. Pathogenesis of bony pocket formation around dental implants. *J Dent Assoc S Afr.* 1992;47(5):204-8.

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

Feinerman O, Germain RN, Altan-Bonnet G. Quantitative challenges in understanding ligand discrimination by alphabeta T cells. *Mol Immunol.* 2008;45(3):619-31.

Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol.* 2003;30(1):14-8.

Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2010;53:167-81.

Konstantinidis IK, Kotsakis GA, Gerdes S, Walter MH. Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases. *Eur J Oral Implantol.* 2015;8(1):75-88.

Kuula H, Salo T, Pirila E, Hagstrom J, Luomanen M, Gutierrez-Fernandez A, et al. Human beta-defensin-1 and -2 and matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. *Arch Oral Biol.* 2008;53(2):175-86.

Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(12):1305-12.

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

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(Pt 2):279-94.

Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(10):2636-49.

Mombelli A, Decaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:203-13.

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

Salvi GE, Furst MM, Lang NP, Persson GR. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(3):242-8.

Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA. TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):247-54.

Suri-Payer E, Fritzsching B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28(1):3-16.

Tabanella G, Nowzari H, Slots J. Clinical and microbiological determinants of ailing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009;11(1):24-36.

Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(12):883-9.