

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IL-1 β NO FLUIDO SULCULAR PERI-IMPLANTAR DE PACIENTES COM IMPLANTES SAUDÁVEIS E COM MUCOSITE

CARLA SILVA SIQUEIRA¹, FLAVIANA SOARES ROCHA², CAMILLA CHRISTIAN GOMES MOURA³, MARIA APARECIDA DE SOUZA⁴, PAULA DECHICHI⁵, DARCENY ZANETTA BARBOSA⁶

Resumo

O fluido sulcular peri-implantar (FSPI) possui moléculas que podem ser utilizadas como marcadores, permitindo avaliação da saúde peri-implantar. A IL-1 β é um mediador pró-inflamatório encontrado no FSPI, porém, seu potencial no diagnóstico precoce de doenças peri-implantares não está completamente esclarecido. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de IL-1 β no FSPI para investigar o potencial desta citocina como indicador precoce de alterações peri-implantares. Foram selecionados para este estudo 40 indivíduos desdentados parciais (totalizando 91 implantes). A condição peri-implantar foi avaliada e classificada (saudável, mucosite leve ou moderada) de acordo com os parâmetros clínicos: profundidade de sondagem (PS) e índice de sangramento marginal (IS). O FSPI foi coletado em 6 sítios, em cada implante, com pontas endodônticas de papel absorvente. Os níveis de IL-1 β foram quantificados utilizando a técnica ELISA de captura e analisados pelos testes Mann-whitney, Kruskal-wallis e Dunns. O grupo mucosite moderada obteve maiores valores de PS se comparado aos grupos saudável e mucosite leve ($p < 0,0001$). Os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo mucosite moderada ($25,32 \pm 3,92$ pg/ml) quando comparados aos grupos saudável

¹ Acadêmica do Curso de Odontologia-UFU(bolsista PIBIC UFU/CNPq). Av. Pará, 1720-Bloco 2U Umuarama Uberlândia-MG Cep.: 38401-136 carlassiqueira@yahoo.com.br

² Acadêmica do Curso de mestrado da Faculdade de Odontologia – Área de Concentração CTBMF – UFU - Av. Pará, 1720-Bloco 2U Umuarama Uberlândia-MG Cep.: 38401-136 flavianinha_soares@yahoo.com.br

³ Mestre em Odontologia e Doutora em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – UFU - Av. Pará, 1720, Bloco 6T, Lab. Biologia Molecular Umuarama Uberlândia-MG Cep: 38400-902 camillahistologia@yahoo.com.br

⁴ Professora titular Instituto de Ciências Biomédicas (Departamento de Imunologia) – UFU - Av. Pará, 1720, Bloco 6T, Lab .Biologia Molecular Umuarama Uberlândia-MG Cep: 38400-902 souza.maria917@gmail.com

⁵ Professora titular Instituto de Ciências Biomédicas (Departamento de Morfologia) – UFU - Av. Pará, 1720-Bloco 2U Umuarama Uberlândia-MG Cep.: 38401-136 pauladechichi@umuarama.ufu.br

⁶ Professor titular da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia - Faculdade de Odontologia – UFU Av. Pará, 1720-Bloco 2U Umuarama Uberlândia-MG Cep.: 38401-136 zanetta@ufu.br

(23,64±1,50 pg/ml) e mucosite leve (18,78±3,59 pg/ml), porém, essa diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,51$). Conclui-se, portanto, que a citocina IL-1 β não representa um bom marcador precoce de alterações peri-implantares. Mais estudos avaliando IL-1 β no FSPI são necessários para identificar seu possível uso como marcador no prognóstico de formas mais severas da doença peri-implantar.

Descritores: Implante Dentário, Inflamação, Citocinas.

ANALYSIS OF IL-1 β LEVELS IN PERI-IMPLANT SULCUS FLUID OF PATIENTS WITH HEALTHY OR INFLAMMED IMPLANTS

Abstract

Peri-implant sulcus fluid (FSPI) has various molecules that can be used as markers, allowing periimplant health control. The IL-1 β is a pro-inflammatory mediator found in FSPI, however, its potential in early diagnosis of peri-implant diseases is not completely understood. The aim of this study was to evaluate the levels of IL-1 β in FSPI to investigate the potential of this cytokine as an early indicator of peri-implant changes. Were selected for this study 40 partially edentulous individuals (with a total of 91 implants). Peri-implant condition was evaluated and classified (healthy, slight or moderate mucositis) in accordance with the clinical parameters: probing depth (PS) and marginal bleeding index (IS). The FSPI was collected on 6 sites in each implant with endodontic paper points. IL-1 β levels were quantified using capture Elisa technique and analyzed with Mann-Whitney, Kruskal-wallis and Dunns tests. The moderate mucositis group obtained the highest PS values compared to healthy and slight mucositis groups ($p<0.0001$). IL1 β levels were greater in moderate mucosistis group (25.32±3.92 pg/mL) when compared to healthy (23.64 ± 1.5 pg/mL) and slight mucositis groups (18.78 ± 3.59 pg/mL), however, it was not significant ($p = 0.51$). The cytokine IL-1 β does not represent a good marker of early peri-implant changes. Further studies evaluating IL-1 β levels in FSPI are required to identify its possible use as a marker in prognosis of severe forms of peri-implant disease.

Descriptors: dental implants, inflammation, cytokines.

1. INTRODUÇÃO

A implantodontia representa um grande avanço da Odontologia moderna, apresentando altas taxas de sucesso. Entretanto, ainda ocorrem perdas de implantes tanto nas fases iniciais, pós-cirúrgicas, durante o período de osseointegração, como nas fases tardias, após os implantes estarem em função mastigatória (Liskman et al., 2004). A instalação de uma inflamação inicial nos tecidos moles peri-implantares (mucosite) pode evoluir rapidamente para uma inflamação severa, levando à perda óssea irreversível (peri-implantite) e à perda de inserção dos implantes (Kivela-Rajamaki et al., 2003A; Kivela-Rajamaki et al., 2003B).

Para avaliar os diferentes sistemas de implantes em função mastigatória, são utilizadas avaliações clínicas e radiográficas (Kivela-Rajamaki et al., 2003B; Liskman et al., 2004). No entanto esses critérios de avaliação não permitem acompanhar alterações iniciais no sítio peri-implantar (Liskman et al., 2004).

Atualmente, atenção especial tem sido dada a métodos de diagnóstico complementar, que permitam detectar modificações na composição do fluido peri-implantar e possam refletir

alterações iniciais no sítio peri-implantar, em estágios ainda não detectáveis em exames clínicos e radiográficos (Yalçın et al., 2005). Métodos dessa natureza vêm sendo bastante estudados na doença periodontal com objetivo de identificar marcadores biológicos presentes no fluido sulcular (Ebersole, 2003; Ozmeric, 2004; Berglundh & Donati, 2005; Loos & Tjoa, 2005).

As semelhanças entre o microambiente periodontal e peri-implantar, levaram os pesquisadores a investigarem no fluido peri-implantar os mesmos marcadores utilizados no diagnóstico das periodontites (Liskmann et al., 2004; Yalçın et al., 2005). O estabelecimento de novos padrões de diagnóstico, baseados em imunoglobulinas e citocinas presentes no fluido sulcular peri-implantar pode constituir um método complementar para avaliação e acompanhamento longitudinal de diferentes tipos de implantes (Yalçın et al., 2005; Duarte et al., 2009A-B).

A interleucina 1 β (IL1 β) é um dos vários mediadores da inflamação que foram identificados no fluido sulcular (Konradsson & Van Dijken, 2005). É produzida, predominantemente, por macrófagos ou por linfócitos, mas também pode ser

liberada por plaquetas sanguíneas, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (Dinarello, 1990; Lipsky et al., 1989). Ela é capaz de induzir sua própria produção (Dinarello et al., 1987), bem como de ampliar e perpetuar a resposta inflamatória e a destruição tecidual (Page, 1991).

Kao et al. (1995), Panagakos et al. (1996) e Murata et al. (2002), demonstraram que a concentração de IL1 β no fluido sulcular peri-implantar, está aumentada na condição de doença, quando comparada à saúde peri-implantar. A observação de que a concentração da IL1 β no fluido sulcular aumenta de acordo com o grau de severidade da doença (saúde, mucosite e peri-implantite), sugere que esta citocina esteja relacionada à rápida e ampla destruição do tecido de suporte observado durante a progressão do processo inflamatório (Panagakos et al., 1996). Assim, IL1 β poderia ser um indicador para o monitoramento da saúde/doença em implantes osseointegrados (Kao et al., 1995), porém, pouquíssimos estudos efetivamente avaliaram a presença desse mediador inflamatório em associação a doenças peri-implantares (Andreiotelli et al., 2008).

Foram avaliados, portanto, os níveis de IL-1 β , presentes nas amostras

no fluido peri-implantar de pacientes parcialmente edêntulos, buscando comparar apenas indivíduos com implantes saudáveis e com mucosite, condição clínica mais freqüente que a peri-implantite e que é passível de tratamento. A conclusão deste experimento auxiliará no desenho do perfil de resposta imune no microambiente peri-implantar, contribuindo com os estudos que tem procurado estabelecer uma forma de diagnóstico precoce e acompanhamento da saúde peri-implantar mais rápida e eficiente que as avaliações clínicas e radiográficas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram previamente autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFU. Os indivíduos foram orientados sobre os procedimentos e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido autorizando a realização dos mesmos.

Participaram deste estudo quarenta indivíduos desdentados parciais, sendo 15 homens e 25 mulheres, com idades entre 25 e 65 anos, que receberam implantes dentais na clínica do curso de Especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de

Uberlândia, no período de 1998 a 2008.

Os critérios observados para inclusão dos indivíduos foram: indivíduos saudáveis (sem alteração sistêmica); não-fumantes; não estivessem grávidas ou lactantes; não utilizassem medicamentos como antibióticos, antiinflamatórios, imunossupressores ou qualquer outra medicação que pudesse interferir na condição peri-implantar, nos últimos 3 meses; não apresentassem história de terapia periodontal ou peri-implantar durante os últimos 6 meses; possuísem implantes e as respectivas próteses, em função, há pelo menos 6 meses.

2.1 Material

Para o exame do paciente foram utilizados: ficha clínica, sonda periodontal, espelho, pinça, cone de papel absorvente para coleta do fluido e tampão da amostra para armazenagem (0.5M NaCl, 50nM Tris-HCl e 5mM CaCl₂). Para a dosagem de citocinas foram utilizadas: placas de ELISA de alta afinidade, kit de Elisa da marca e-Bioscience para dosagem de IL-1 β .

2.2 Métodos

Procedimentos clínicos

Na primeira consulta realizou-se anamnese e exame clínico. Os indivíduos foram questionados sobre

sua condição sistêmica atual. Em seguida, nova ficha foi preenchida para avaliar os parâmetros clínicos índice de placa (IP) (Mombelli et al., 1987) e índice de mucosa ceratinizada (IMC) (Cox e Zarb, 1987). Após o preenchimento desses dados, foi coletado o fluido sulcular peri-implantar (FSPI) em todos os implantes presentes. Após essas coletas, foram medidos o índice de sangramento (IS) (Mombelli et al. 1987) e a profundidade do sulco peri-implantar (PS) (Yalçın et al., 2005). Avaliou-se também a presença de supuração e mobilidade. O exame clínico e a coleta do fluido foram realizados em 6 sítios peri-implantares (disto-vestibular: DV, vestibular central: VC, mesial-vestibular: MV, disto-lingual: DL, lingual central: LC e mesio-lingual: ML) por um único examinador treinado e calibrado.

Coleta do fluido

Em cada indivíduo, previamente à coleta, foi realizada remoção de placa supra-gengival sem tocar a gengiva marginal. A saliva da superfície da coroa dos implantes a serem avaliados era gentilmente seca com jato de ar e a mesma eram isolados com roletes de algodão para evitar contaminação. Em seguida, pontas endodônticas de papel absorvente padronizadas número 30 (TANARI-Manacapuru-AM-Brasil)

(Perinetti & Spoto, 2004) foram introduzidas aproximadamente 1mm no interior do sulco peri-implantar, e deixadas por 30 segundos para absorção do fluido sulcular (Yalçın et al., 2005) (Figura 1).

Em cada implante foram utilizadas 6 pontas, uma para cada face. Imediatamente após a coleta do fluido as pontas foram colocadas em tubos eppendorf contendo 300 µl de solução de armazenamento contendo 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl e 5mM CaCl₂ e mantidas em banho de gelo até serem iniciados os procedimentos para extração do fluido absorvido no cone. Cada eppendorf recebeu 1 ponta de papel absorvente, correspondente à face em que foi feita a coleta do fluido. Para extração do fluido absorvido pelos cones, os eppendorf foram centrifugados (FANEM-Mod. 243 Série GV 6618 - São Paulo - Brasil). O sobrenadante foi coletado, congelado a -20° para utilização nas dosagens de IL1β.

Sondagem peri-implantar

A sondagem nos sítios peri-implantares foi realizada com uma sonda periodontal milimetrada estéril (Golgran/Brasil®, São Paulo, SP, Brazil), que foi introduzida em todas as faces pré-estabelecidas, de forma suave, até encontrar ligeira resistência (Figura

2). Os valores obtidos em cada face foram, anotados e associados aos outros parâmetros clínicos para classificação do implante em saudável ou com mucosite.



Figura 1. Coleta do FSPI utilizando pontas de papel absorvente endodônticas.



Figura 2. Introdução de sonda milimetrada para marcação da PS.

Classificação dos sítios peri-implantares

Inicialmente os sítios peri-implantares dos pacientes foram alocados em 2 grupos: sem inflamação e

com inflamação (mucosite). Foram considerados sem inflamação os sítios que possuísem índice de sangramento igual a zero (Tozum et al., 2007 A-B) e com inflamação os com profundidade de sondagem menor ou igual a 4 mm, índice de sangramento maior ou igual a 1 e índice de placa maior ou igual a zero (Murata et al 2002 adaptado). Imediatamente após, os sítios peri-implantares com inflamação (mucosite) foram subdivididos considerando a severidade da inflamação, sendo que o índice de sangramento igual a 1 representa a inflamação leve e o índice de sangramento maior que 1 representa a inflamação moderada (Tozum et al., 2007). A peri-implantite não foi considerada neste estudo.

Procedimentos laboratoriais

Amostras do fluido foram submetidas à técnica de ELISA de Captura. Placas de alta afinidade com 96 poços foram adsorvidas com 50 μ L/poço do anticorpo de captura, monoclonal, obtido de rato, anti-citocina de humano, nas concentrações adequadas e incubadas de um dia para o outro à temperatura de 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e bloqueadas com 100 μ L/poço de diluente de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas

foram lavadas 5 vezes com PBS-T. Após a lavagem, foram adicionados 50 μ L/poço das amostras ou do padrão correspondente à citocina, que permaneceram incubados de um dia para o outro à 4°C. Novamente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e foram adicionados 50 μ L/poço do anticorpo de detecção conjugado a Biotina, na concentração adequada e as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 5 lavagens com PBS-T e adicionados 50 μ L/poço do conjugado peroxidase-estreptavidina (Avidin-HPR), sendo as placas incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e, em seguida, foram colocados 50 μ L do substrato enzimático (1X TBM solution) em cada poço e as placas incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. Os níveis de absorbância foram obtidos a 450nm utilizando uma Leitora de ELISA (Titertek Multiskan Plus - Flow Laboratories, Mclean, VA, EUA).

As concentrações da citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão, previamente estabelecida, com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prisma version 5.0 for Windows. Foi utilizado o teste Kolmogorov-smirnov para verificação se os dados apresentavam distribuição normal e, posteriormente, foram utilizados os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (pós-teste de Dunns). Valores expressos em média/desvio padrão para os parâmetros clínicos e média/erro padrão para a dosagem de IL1 β .

3. RESULTADOS

O grupo mucosite moderada obteve maiores valores de profundidade de sondagem se comparados aos grupos saudável e mucosite leve ($p < 0,0001$) (Figura 3).

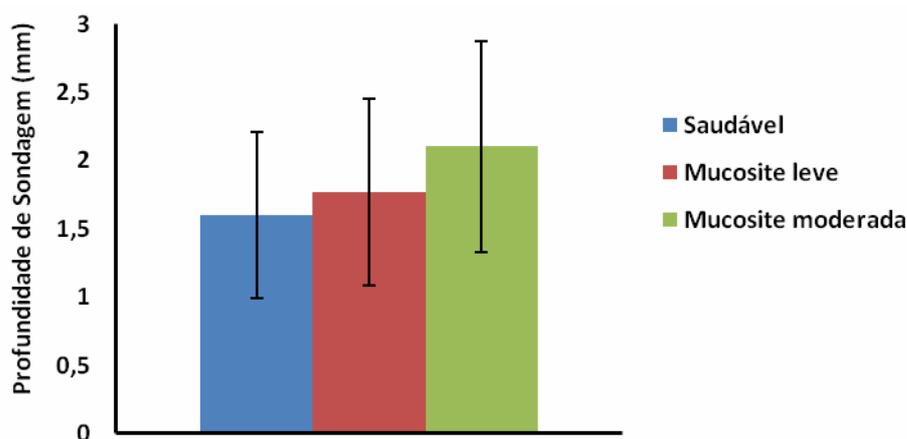


Figura 3. Profundidade de sondagem em pacientes considerados saudáveis, com mucosite leve e com mucosite moderada (***) $p < 0,0001$.

A porcentagem de sítios com índice de placa igual a zero é maior no grupo saudável. Em ambos os grupos com inflamação, houve aumento da porcentagem de sítios com índice maior que zero, se comparado ao grupo saudável (Figura 4)

A porcentagem de sítios com índice de mucosa ceratinizada igual a zero foi maior no grupo mucosite moderada (Figura 5).

Os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo mucosite moderada ($25,32 \pm 3,92$ pg/ml) quando comparados ao grupo saudável ($23,64 \pm 1,50$ pg/ml) e mucosite leve ($18,78 \pm 3,59$ pg/ml), conforme previsto, porém, não foram significantes ($p = 0,51$) (Figura 6).

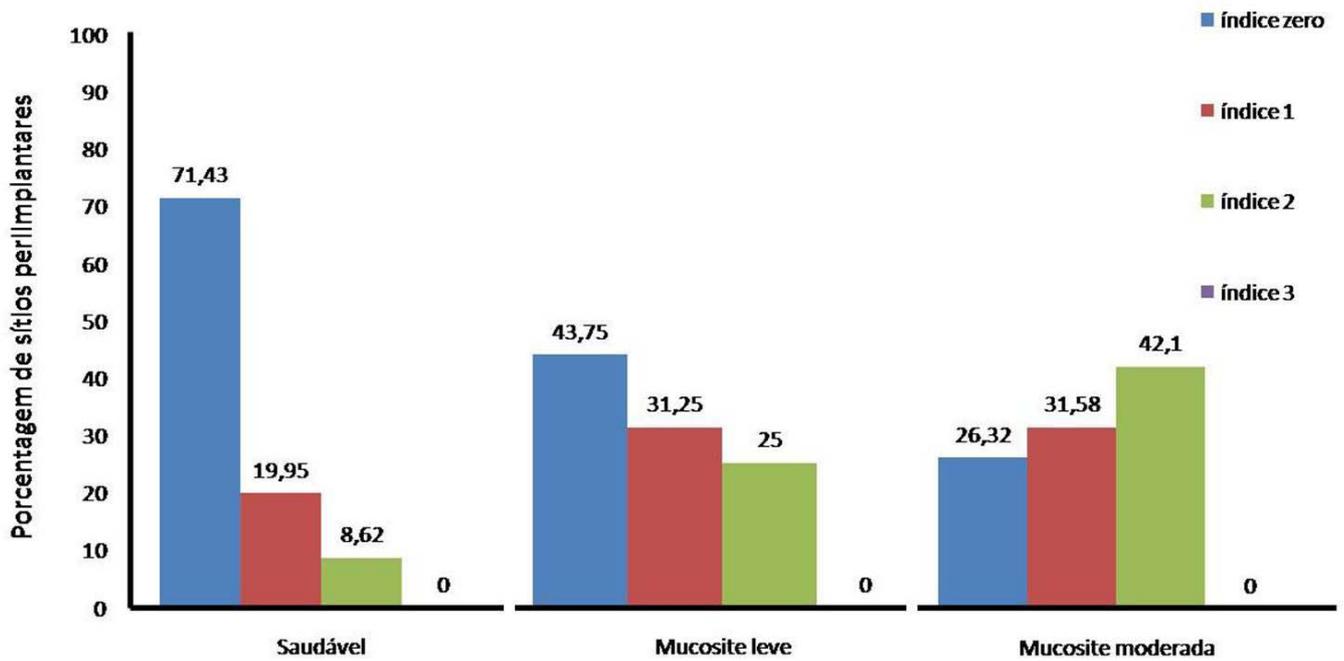


Figura 4. Índice de placa em pacientes considerados saudáveis, com mucosite leve e com mucosite moderada.

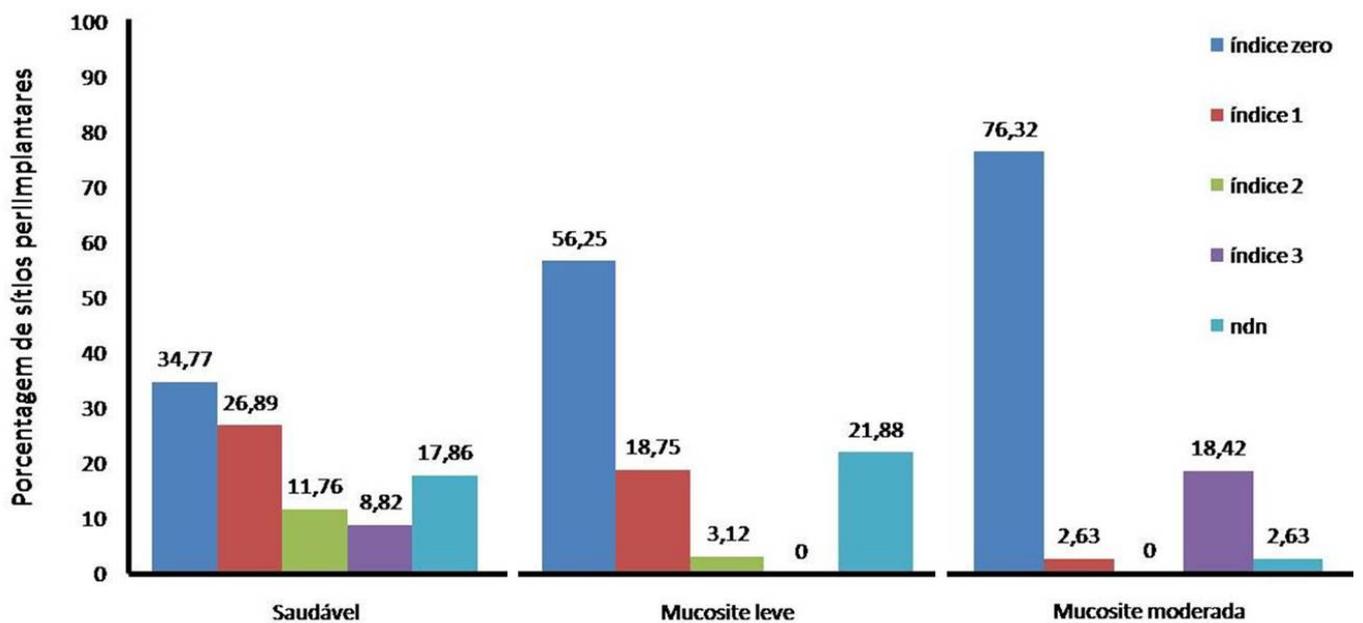


Figura 5. Índice de mucosa ceratinizada em pacientes considerados saudáveis, com mucosite leve e com mucosite moderada.

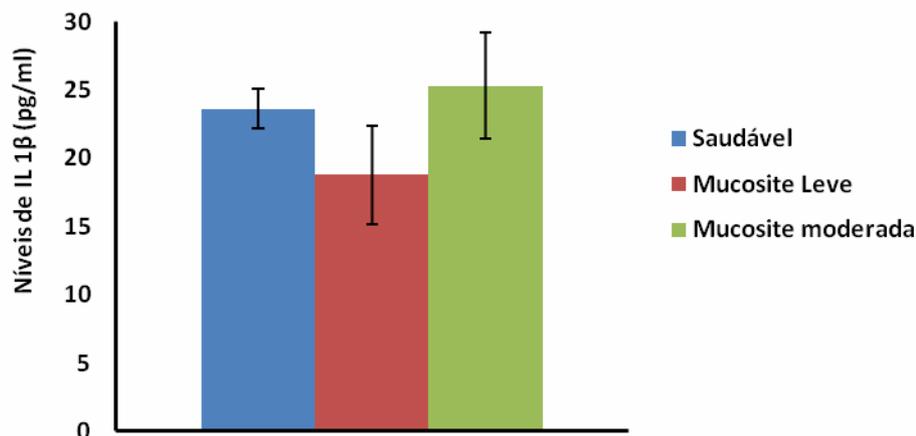


Figura 6. Níveis de IL-1 β em pacientes considerados saudáveis, com mucosite leve e mucosite moderada ($p=0,51$).

4. DISCUSSÃO

Apesar de a Implantodontia representar um sucesso no que diz respeito à Reabilitação Oral, ainda ocorre perda dos implantes, tanto nos períodos iniciais da osseointegração quanto em fases tardias, em que o implante já se encontra em função.

A instalação de uma inflamação inicial pode, rapidamente, levar a uma perda de inserção dos implantes, o que não ocorre em dentes naturais (Kivela-Rajamaki et al., 2003A; Kivela-Rajamaki et al., 2003B). Isso acontece devido à disposição e morfologia dos tecidos peri-implantares que, embora semelhantes aos tecidos periodontais, exibem algumas peculiaridades. Os feixes de fibras colágenas, que nos dentes se apresentam em diversas direções, nos implantes estão dispostos paralelamente ao longo eixo do

implante, o que faz com que a barreira de mucosa peri-implantar seja mais frágil, permitindo progressão da doença com mais facilidade (Weber & Cochran 1998). Sendo assim, métodos de detecção precoce da doença são importantes para a manutenção dos implantes.

Critérios clínicos atuais não são eficientes para diagnosticar as inflamações em seu estágio precoce, pois, tanto clínica quanto radiograficamente, as alterações peri-implantares são evidenciadas somente em estágios avançados, quando, muitas vezes, os tratamentos existentes já se fazem ineficazes (Yalçın et al., 2005; Duarte et al., 2009A-B).

O índice de sangramento, utilizado para classificar os sítios peri-implantares, parece ser um parâmetro mais confiável do que o sangramento a

sondagem. O sangramento marginal representa a tendência ao sangramento espontâneo da mucosa, o que ocorre prontamente em tecidos inflamados. Já o sangramento à sondagem, embora ainda utilizado, pode sofrer influência da força e posição do instrumento durante a sondagem, bem como da anatomia e posição da mucosa (Kivela-Rajamaki et al., 2003b), oferecendo valores menos confiáveis.

Os valores de profundidade de sondagem e índice de placa foram maiores no grupo mucosite se comparado ao grupo saudável, sendo o de mucosite moderada o que apresentou os valores mais elevados. Esses valores condizem com a realidade clínica encontrada, visto que a mucosa se torna inflamada devido ao maior acúmulo de biofilme dental (placa) na superfície dentária. As bactérias presentes no biofilme, através da liberação de toxinas, provocam um processo inflamatório, que leva à destruição tecidual e, conseqüentemente, elevação dos valores de profundidade de sondagem se comparada à pacientes saudáveis, que apresentam índices de placa menores. Embora o índice de placa não seja considerado por alguns autores como um bom parâmetro a ser avaliado devido à possibilidade do paciente melhorar a higienização apenas

no dia do exame, no presente trabalho, foi demonstrado coerência nos resultados.

Os exames clínicos foram realizados pelo mesmo examinador, a fim de se obter valores mais fiéis, reduzindo a possibilidade de variações com relação à força utilizada durante a sondagem. Além disso, foi utilizada sonda milimetrada da mesma marca comercial em todos os pacientes, também com o objetivo de reduzir as variáveis no presente estudo.

Como método de diagnóstico, a citocina IL-1 β foi escolhida para este estudo devido a sua importância para a progressão do processo inflamatório. Esta citocina atua na ativação dos osteoclastos (Garlet et al., 2004) e produção de metaloproteinases (Chang et al., 2002), intimamente relacionadas com o processo de reabsorção óssea e também a degradação das fibras colágenas, que contribuem para a progressão da doença.

O método ELISA de captura foi utilizado para se detectar a presença e a intensidade da IL-1 β nas faces onde foram colhidas amostras do fluido peri-implantar. As concentrações da citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão, previamente estabelecida, com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. O ELISA

consiste em um método eficaz e relativamente simples de ser realizado, o que favorece seu uso. Um dos inconvenientes, no entanto, é o custo elevado dos kits disponíveis no mercado.

Os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo mucosite moderada se comparado aos demais grupos, porém não foram significantes. O presente estudo avaliou apenas estágios iniciais do processo inflamatório e, sendo a IL-1 β uma citocina classicamente ligada a estágios avançados de inflamação (Konradsson & Van Dijken, 2005), seus níveis em situações clínicas de mucosite não se apresentaram elevados, como esperado. Esta citocina não é um bom marcador de estágios iniciais de inflamação, entretanto, é sugerido na literatura seu possível uso como forma de monitoramento do tratamento em implantes com formas severas de doença peri-implantar (Machtei et al 2006). Sendo assim, estudos avaliando a expressão desta citocina em condições clínicas de doença peri-implantar em estágios avançados, correlacionando com diversas modalidades de tratamento, podem ser interessantes.

5. CONCLUSÃO

A citocina IL-1 β não representa um bom marcador precoce de alterações

peri-implantares. Mais estudos avaliando IL-1 β no fluido sulcular peri-implantar são necessários para identificar seu possível uso como marcador no prognóstico de formas mais severas da doença peri-implantar.

6. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREIOTELLI, M.; KOUTAYAS, S.O.; MADIANOS, P.N.; STRUB, J.R. Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantites: A literature review. *Quintessence International*. v. 39, n. 4, p. 289-298, 2008.
2. BERGLUNDH, T.; DONATI M. Aspects of adaptative host response in periodontitis. *J Clin Peiodontol*. v.32 (Suppl. 6), p. 87-107, 2005.
3. CHANG, Y.C.; YANG, S.F.; LAI, C.C.; LIU, J.Y.; HSIEH, Y.S. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and pperiodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res* v.37 p.196-203, 2002.

4. COX, J.F.; ZARB, G.A. The longitudinal clinical efficacy of osseo-integrated implants: a 3-year report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. v.2, p. 91-100, 1987.
5. DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. In: Cohen S. Ed. *Lymphokines and the immune response*. Boca Raton, FL: CRC Press p.145-179, 1990.
6. DINARELLO, C.A.; IKEJIMA, T.; WARNER, S.F.C.; et al. Interleukin-1 induces interleukin-1. Induction of interleukin-1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* v. 139, p.1902-1910, 1987.
7. DUARTE, P.M.; DE MENDONÇA, A.C.; MÁXIMO, M.B.; SANTOS, V.R.; BASTOS, M.F.; NOCITI, F.H. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):234-43. A
8. DUARTE, P.M.; DE MENDONÇA, A.C.; MÁXIMO, M.B.; SANTOS, V.R.; BASTOS, M.F.; NOCITI, F.H. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Mar 9. [Epub ahead of print]. B
9. EBERSOLE, J.L. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol* 2000 v. 31, p.135-66, 2003.
10. GARLET, G.P.; MARTINS, W. Jr.; FONSECA, B.A.; FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* v.31, p.671-679, 2004.
11. KAO, R.T.; CURTIS, D.A.; RICHARDS, D.W.; PREBLE, J. Increased interleukin-1B in the crevicular fluid of diseased implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* v.10, p. 696-701, 1995.
12. KIVELA-RAJAMAKI, 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 Periodontal Res.* v.38, n.6, p.583-90, 2003A.
13. KIVELA-RAJAMAKI, M.J.; TERONEN, O.P.; MAISI, P.; HUSA, V.; TERVAHARTIALA, T.I.; PIRILA, E.M.; SALO, T.A.; MELLANEN, L.; SORSA, T.A. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. *Clin Oral Implants Res.* v.14, n.2, p. 158-65, 2003B.
 14. KONRADSSON, K.; VAN DIJKEN, J.W. Interleukin-1 levels in gingival crevicular fluid adjacent to restorations of calcium aluminate cement and resin composite. *J Clin Periodontol.* 2005 May;32(5):462-6.
 15. LIPSKY, E.; DAVIS, L.S.; CUSH, J.J.; OPPENHEIMER-MARKS, N. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopath* v.11, p.123-162, 1989.
 16. LISKMANN, S.; ZILMER, M.; VIHALEMM, T.; SALUM, O.; FISCHER, K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. *Clin Oral Implants Res.* v. 15, n.5, p.546-52, 2004.
 17. LOOS, B.G.; TJOA S. Host derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevicular fluid? *Periodontol* 2000 v. 39, p.53-72, 2005.
 18. MACHTEL, E.E.; OVED-PELEG, E.; PELED, M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implant platforms. *Clinical Oral Implants Research.* 2006; 17: 658–665.
 19. MOMBELLI, A.; VAN OOSTEN, M.A.C.; SCHURCH, E., et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol.* v. 2, p.145-151, 1987.
 20. MURATA, M.; TATSUMI, J.; KATO, Y.; SUDA, S.; NUNOKAWA, Y.; KOBAYASHI, Y.; TAKEDA, H.; ARAKI, H.; SHIN, K.; OKUDA, K.; MIYATA, T.; YOSHIE, H. Osteocalcin, deoxypyridinoline and

- interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Dec;13(6):637-43.
21. OZMERIC N. Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta* v. 343, p.1-16, 2004.
 22. PAGE R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* v. 26, p. 230-242, 1991.
 23. PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Structure and pathogenesis. In: Schluger, S.; Yuodelis, R.A.; Page, R.C., eds. *Periodontal Diseases*, 2nd ed. Philadelphia: Lea Febiger; pg. 183, 1990.
 24. PANAGAKOS, F.S.; ABOYOUSSEF, H.; DONDERO, R.; JANDINSKI, J.J. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* v. 11, p.794-799, 1996.
 25. PERINETTI, G.; PAOLANTONIO, M.; SERRA, E.; D'ARCHIVIO, D.; D'ERCOLE, S.; FESTA, F.; SPOTO, G. Longitudinal monitoring of subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and crevicular alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities around orthodontically treated teeth. *J Clin Periodontol.* 2004 Jan;31(1):60-7.
 26. TOZUM, T.F.; AKMAN, A.C.; YAMALIK, N.; TULUNOGLU, I.; TURKYILMAZ, I.; KARABULUT, E.; KILINC, K.; CEHREL M.C. Analysis of the inflammatory process around endosseous dental implants and natural teeth: myeloperoxidase level and nitric oxide metabolism. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Nov-Dec;22(6):969-79 (A).
 27. TOZUM, T.F.; TURKYILMANZ, I.; YAMALIK, N.; TUMER, C.; KILINÇ A.; KILINÇ, K.; KARABULUT, E.; ERATALAY, K. The effect of delayed versus early loading on nitric oxide metabolism around dental implants: an 18-month comparative follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Jan-Feb;22(1):53-62 (B).

28. WEBER, H.P.; COCHRAN, D.L. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent.* 1998 Jan;79(1):79-89.
29. YALÇIN, S.; BASEGMEZ, C.; MIJIRITSKY, E.; YALÇIN, F.; ISIK, G.; ONAN, U. Detection of implant crevicular fluid prostaglandin E2 levels for the assessment of peri-implant health: a pilot study. *Implant Dent.* v. 14, n.2, p. 194-200, 2005.