

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós Graduação em Odontologia



Dissertação

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais.

Amália Machado Bielemann

Pelotas, 2016

Amália Machado Bielemann

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Prótese Dentária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Faot

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B587c Bielemann, Amália Machado

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais / Amália Machado Bielemann ; Fernanda Faot, orientadora. — Pelotas, 2016.

88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Prótese Dentária, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Marcadores biológicos. 2. Citocinas. 3. Implante dental. 4. Osseointegração. 5. Cicatrização. I. Faot, Fernanda, orient. II. Título.

Black : D3

Amália Machado Bielemann

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração em Prótese Dentária), Programa de Pós Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2016

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Fernanda Faot (Orientadora)

Doutora em Clínica Odontológica (Área de Concentração Prótese Dentária) pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Luciana de Rezende Pinto

Doutora em Clínica Odontológica (Área de Concentração Prótese Dentária) pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Natália Marcumini Pola

Doutora em Odontologia, (Área de Concentração Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Brasil.

Dr^o. José Antônio Mesquita Damé

Doutor em Odontologia, (Área de Concentração Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Brasil.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas através de seu Reitor e à Faculdade de Odontologia através de sua Diretora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas a seus professores pela grande oportunidade de aperfeiçoamento.

À CAPES, pelo apoio financeiro e assim a possibilidade de me dedicar exclusivamente a este estudo

A minha orientadora Prof^a Dr^a Fernanda Faot, por ter me guiado e incentivado durante esta trajetória e assim ter se tornado minha referência. Agradeço a parceria de trabalho, lazer e amizade, a tua paciência comigo e o “gosto” pelo prazo final. Obrigado!

Aos Professores Dr^o Otacílio Chagas Jr. e Dr^o. Fábio Renato Manzolli Leite pela parceria, disponibilidade para os momentos de discussão, aprendizado e execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr^o José Antônio Damé e a Prof^a Dr^a Luciana Rezende pela amizade e disponibilidade.

Aos colegas de pós, em especial Lucas, Tom, Karine, Marina, Gustavo, Ana Martins e Ana Possebon, os quais me acompanham, espero que essa amizade perdure.

As colegas/amigas/companheiras, Ana, Raissa e Alessandra, pela grande amizade e principalmente pelo apoio, tanto em momentos de estresse quanto na alegria!

A minha família por serem a base e o encorajamento. A Minha mãe, que sempre me incentivou a continuar os estudos, que tem a paciência de me aturar nos momentos mais difíceis, e entender que às vezes só o espaço resolve alguns problemas. Ao meu Pai e minha Avó, pela compreensão do meu distanciamento, e ao meu irmão pela atenção.

As minhas grandes amigas e por todas as diferenças que nos unem. Pela torcida que temos umas nas outras e por sempre estarem dispostas. E principalmente as minhas, Laura e Nathalia, por todos os momentos compartilhados bem como pela liberdade de irmãs que temos.

Por fim, agradeço a todos que trabalharam de forma direta e indireta para que este trabalho pudesse ser realizado. Agradeço a Profª Drª Melissa Damian e aos técnicos da radiologia pela disposição e por atenderem nossos pedidos de urgência. Aos funcionários do segundo andar sempre solícitos quando era necessário e principalmente pela preocupação de continuarmos trabalhando quando o expediente deles já havia sido finalizado, e principalmente ao Nilson, que foi um braço direito para que eu conseguisse cumprir algumas metas. A equipe de segurança pela atenção sempre ao fazer a ronda. As secretárias pelo cuidado com nossos pacientes, dando-lhes informações quando necessário.

É difícil e impossível citar cada um que contribuiu pra que este trabalho fosse realizado, mas agradeço a todos que contribuíram de alguma forma, a ajuda de vocês foi imprescindível.

Muito obrigado a Todos!

*Dever é rotina de instrução.
Disciplina é condição de êxito.
Dificuldade é exercício de aperfeiçoamento.
Conflito é aula de reequilíbrio.
Tentação é repetência de testes nos quais já falimos...
Obstáculo é o desafio para a melhora de resistência.
(Francisco Candido Xavier – Emmanuel)*

Notas Preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: 02/02/2016.

O projeto de pesquisa contido nesta dissertação é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 18 de Novembro de 2014 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Fernanda Faot (Orientadora), Luciana de Rezende Pinto, Natália Marcumini Pola e Dr. Gustavo Giacomeli Nascimento (Suplente)

Resumo

BIELEMANN, Amália Machado. **Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos durante a osseointegração em desdentados totais.** 2016.88f. Dissertação (Mestrado em Prótese Dentária) Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2016.

Este estudo investigou parâmetros clínicos, a estabilidade do implante e as concentrações de citocinas relacionadas ao processo inflamatório no fluido crevicular peri-implantar (PICF) após a instalação de implantes durante o período de cicatrização óssea. Um total de 60 implantes instalados na região anterior de mandíbula de 30 pacientes desdentados totais (idade média $67,23 \pm 7,66$ anos) foram monitorados até a osseointegração. O tipo ósseo, o torque de inserção e a estabilidade primária foram registrados durante o processo cirúrgico. O registro de escores clínicos de saúde peri-implantar (índice de placa visível, presença de cálculo, grau de inflamação, profundidade de sondagem e índice de sangramento a sondagem), a estabilidade secundária dos implantes e coletas de amostras de PICF foram realizados nos períodos de 1, 2, 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia. Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no PICF foram analisados por ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA). A estabilidade do implante foi mensurada pelo método de análise de frequência de ressonância (RFA). O tempo médio de edentulismo na mandíbula foi $24,53 (\pm 13,29)$ anos e atrofia óssea mandibular foi diagnosticada em 15 pacientes. Um total de 12 implantes falharam em diferentes períodos da osseointegração. Nos implantes saudáveis, o índice inflamação gengival apresentou resultados significativamente diferentes entre a primeira semana e a seguinte ($p = 0,05$). Foi observado um aumento significativo no índice de placa entre as semanas 4-8 e 8-12. Já a profundidade sondagem teve diferenças significativas em todos os intervalos de avaliação. Após a quarta semana a estabilidade secundária reduziu significativamente ao longo do tempo. Níveis significativamente elevados de TNF- α foram registrados na segunda semana, em pacientes não-atróficos, e na quarta semana (em pacientes atróficos); após estes períodos suas concentrações diminuíram ($p < 0,05$). Entretanto, pacientes com atrofia óssea tinham níveis significativamente mais elevados de TNF- α nas semanas 4 e 8. As concentrações de IL-1 β aumentaram somente após 12 semanas ($p = 0,003$), e os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores para os pacientes com atrofia óssea durante as primeiras duas semanas. O pico de concentração de IL-6 foi observado na primeira semana ($p < 0,05$; $p = 0,005$) e foi significativamente mais elevado em pacientes com atrofia óssea nas semanas 1, 2 e 4. As concentrações de IL-10 aumentaram progressivamente ao longo do tempo, sendo a concentração mais elevada no 12^a semana ($p < 0,005$). O hábito de fumar, o quadro de atrofia óssea mandibular e o tipo ósseo, parecem influenciar de diferentes formas as concentrações de citocinas durante o período de cicatrização. Embora as medidas clínicas apresentem diferenças entre os períodos de avaliação, eles não foram indicativos de falha precoce do implante ou de doenças peri-implantares. As variações nas concentrações das citocinas e as características predominantes para cada uma podem ser atribuídas ao equilíbrio de cicatrização em diferentes períodos de tempo.

Palavras-chave: Marcadores Biológicos; Citocinas; Implante Dental; Osseointegração; Cicatrização.

Abstract

BIELEMANN, Amália Machado. **A comparison between inflammation-related markers in the peri-implant crevicular fluid and clinical parameters during osseointegration in edentulous jaws.** 2016.88f. Dissertation Project (Master Degree in Prosthodontics). Programa de Pós Graduação em Odontologia - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Aim: To investigate the clinical parameters, implant stability and the cytokine levels in peri-implant crevicular fluid (PICF) during the early bone healing process after implant placement. A total of 60 narrow implants were placed in the anterior region of the mandible in 30 edentulous patients (aged 67.23 ± 7.66 years). Bone type, insertion torque and primary stability were registered during surgery. Clinical measurements of peri-implant health were recorded and samples from the peri-implant crevicular fluid (PICF) were collected 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after the surgery. Levels of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α in the PICF were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Implant stability was assessed by resonance frequency measurements (RFA). Mean time of edentulism in the mandible was $24.53 (\pm 13.29)$ years and mandibular bone atrophy was diagnosed in 15 patients. A total of 12 implants failed at different periods of osseointegration. In the healthy implants, the gingival index displayed significantly different outcomes between the first week the following period ($p= 0.05$). Significant increasing in the plaque index was observed only between the week 4-8 and 8-12. Significant differences in Probing on Depth (PD) were observed at all intervals. The RFA reduced significantly over time after the 4th week. The highest levels of TNF- α were recorded in the first 2 weeks (non-atrophic patients) and 4 weeks (atrophic patients), after which the concentrations declined ($p<0.05$). Patients with bone atrophy had significantly higher TNF- α levels in weeks 4 and 8, compared to their non-atrophic counterparts. IL-1 β concentrations increased only after 12 weeks ($p=0.003$), and IL-1 β levels were significantly higher for patients with atrophy during the first two weeks. IL-6 concentrations peaked in the first week ($p<0.05$; $p=0.005$) and were significantly higher for patients with bone atrophy in weeks 1, 2 and 4. IL-10 concentrations progressively increased over time, with the highest concentration in the 12th week ($p < 0.005$). Smoking, bone atrophy and bone type seems differently influence the cytokines concentrations during the healing time. Although the clinical measurements presented differences between the evaluation periods, they were not indicative of early dental implant failure or peri-implant diseases. The variations in the cytokine concentrations and their predominant role can be attributed to healing balance in different periods of time.

Keywords: *Biological Markers; Cytokines; Dental Implant; Osseointegration; Wound Healing.*

Lista de figuras

Figura 1. Demonstração da utilização do aparelho Ostell Mentor.....	35
---	----

Artigo

Figure 1. Comparative analyses of smoking habit with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.....	64
Figure 2. Comparative analyses of bone atrophy with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.....	65
Figure 3. Comparative analyses of bone type with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.	66
Figure 4. Comparative analyses of insertion torque with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.....	67

Lista de Abreviaturas e Siglas

BOP	Sangramento à sondagem / “Bleeding on probing”
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
FBR	Reação de corpo estranho / “Foreign body reaction”
GI	Índice gengival / “Gingival index”
IL	Interleucina / “Interleukin”
ISQ	Coeficiente de estabilidade do implante / “Implant stability quotient”
mm	Milímetro
MMP	Matriz de Metaloproteinases / “Matrix metalloproteinases”
N	Newton
PD	Profundidade de sondagem / “Probing depth”
pg/ μ L	Picograma/mililitro / “Picogram/microlitre”
PI	Índice de placa / “Plaque index”
PICF	Fluido crevicular peri-implantar / “Peri-implant crevicular fluid”
RFA	Análise de frequência de ressonância / “Resonance frequency measurements”
TGF	Fator de crescimento transformador / “Transforming growth factor”
TNF	Fator de necrose tumoral / “Tumor necrosis factor”
LED	“Light-emitting diode”

Sumário

Introdução	13
Projeto de pesquisa	17
1.Introdução.....	18
2. Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1 Delineamento Experimental.....	27
4.2 Aspectos éticos.....	27
4.3 Seleção dos Participantes.....	27
4.4 Cálculo e Seleção Amostral.....	28
4.5Avaliação das citocinas presentes no fluído peri-implantar.....	33
4.6 Avaliação da estabilidade do implante por análise de frequência de ressonância.....	34

4.7 Avaliação do nível ósseo peri-implantar.....	35
4.8 Exame clínico peri-implantar.....	35
4.9 Análise Estatística.....	36
5. Orçamento.....	37
6. Cronograma.....	38
Relatório de Campo.....	39
Artigo	41
Considerações finais.....	71
Referências.....	72
Apêndices	80
Apêndices A.....	79
Apêndices B.....	83
Apêndices C.....	84
Anexos – Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	85

INTRODUÇÃO

Os implantes dentários osseointegráveis têm um papel importante na reabilitação da função bucal, sendo esta terapêutica de alta previsibilidade e longevidade (BASSI et al., 2013). Entretanto este sucesso só é possível se alcançada a osseointegração, a qual é originalmente descrita como o contato direto entre o tecido ósseo e o implante dentário, e para que esta ocorra, uma sucessão de eventos moleculares são necessários para se iniciar a neoformação e remodelação de tecido ósseo (TRINDADE et al., 2014).

A osseointegração é percebida como uma reação de corpo estranho, ou seja, é um processo de cicatrização imune-modulada, multifatorial, e complexo, em que o implante é reconhecido como um material estranho fazendo com que haja ativação do sistema complemento (TRINDADE et al., 2014). Assim, citocinas, proteínas ou peptídeos multifuncionais irão exercer suas funções como fatores reguladores intercelulares em níveis locais e sistêmicos, modulando por meio de suas expressões a intensidade da resposta inflamatória tanto para os processos de iniciação da reação de corpo estranho, cicatrização quanto aos patológicos (CHANG; LANG; GIANNOBILE, 2010; TERHEYDEN et al., 2012).

Assim, na dinâmica de cicatrização do conjunto osso-implante há o início de um encadeamento da neoformação tecidual, inicialmente caracterizado pela formação de uma rede de fibrina que é composta por hemácias, neutrófilos e monócitos/macrófagos, a qual é sucedida pela fase de fibroplastia, em que já há o surgimento de vasos sanguíneos, a migração de leucócitos e células mesenquimais formando um tecido de granulação (ABRAHAMSSON et al., 2004; SCHROEDER et al., 1981). O tecido conjuntivo provisório que substitui esta fase, já caracteriza a neoformação óssea, representada pela remodelação, a diferenciação e ativação dos osteoclastos (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Durante esta fase, o processo de cicatrização se faz de forma dinâmica, e a

manutenção deste, é dependente do equilíbrio da reação de corpo estranho, em que, se perturbado pode desencadear uma reação inflamatória exacerbada podendo levar a perda da osseointegração.

Logo, monitorar a saúde peri-implantar seria uma forma de mapear estes processos seja pela análise da estabilidade primária e secundária do conjunto osso-implante, como uma forma acompanhar as mudanças na rigidez e estabilidade do conjunto (CHANG et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012); ou por uma análise biológica através da coleta de mediadores da resposta inflamatória presentes no fluido peri-implantar, os quais podem gerar informações quanto a processo de reparo imediato pós-injúria como da angiogênese, a remodelação tecidual e a resposta humoral (SCHRAUFSTATTER et al., 2012). Os métodos já utilizados como exames radiográficos e o monitoramento clínico na saúde dos tecidos peri-implantares são capazes de fornecer informações para mensuração de perda óssea peri-implantar e diagnosticar complicações oriundas de trauma e infecções, respectivamente (PAPASPYRIDAKOS et al., 2012; SCHRAUFSTATTER et al., 2012), entretanto os resultados gerados por estas avaliações não sinais precoces, mas sim, de alterações já desenvolvidas.

Outros fatores importantes a serem observados são as características dos pacientes, principalmente durante o processo de planejamento cirúrgico em que devem ser investigados hábitos, medicações, características do leito receptor do implante, e também durante o processo cirúrgico por meio de análise de tipo ósseo e a estabilidade alcançada na inserção do implante. Quanto aos hábitos, sabe-se que o tabagismo afeta diretamente o processo de cicatrização e tem demonstrado um efeito negativo significativo quanto à sobrevivência dos implantes (CHRCANOVIC; ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2014). O fumo apresenta um efeito nocivo sobre a perda óssea (CLEMENTINI et al., 2014) e a risco de falha para implantes é 14.4 vezes maior (DERKS et al., 2015).

Adicionalmente, qualidade e quantidade óssea também devem ser levadas em consideração, em vista do resultado do tratamento com implantes poder estar associado a qualidade e a reabsorção óssea excessiva do leito receptor, ambos podem acarretar no comprometimento do processo de cicatrização (CHRCANOVIC et al., 2014; JAVED et al., 2013). A arquitetura óssea pode ter diferentes tipos de composição quanto à quantidade de osso trabecular, sendo categorizada em quatro

grupos: tipo I, é um osso com a cortical mais homogênea, com menor suprimento sanguíneo; tipo II, apresenta uma cortical mais espessa com uma cavidade de osso medular; tipo III, apresenta cortical mais fina e um denso trabecular, com uma boa resistência; e tipo IV, caracterizada por um osso mais trabecular de baixa densidade com fina camada de osso cortical (ALBREKTSSON; ZARB, 1998; ZARB, 1985).

Clementini et al. (2014), concluíram em uma revisão sistemática que a maioria dos estudos relataram um aumento da taxa de falha dos implantes quando inseridos em osso tipo III/IV e tipo IV, e ainda o osso tipo I também pode resultar em aumento da taxa de falha do implante devido a sua baixa irrigação sanguínea (CLEMENTINI et al., 2014). Entretanto, alguns estudos não apresentaram uma significativa influência da qualidade, mas sim da disponibilidade óssea, em que leitos receptores com maior altura óssea, que possibilitem a instalação de implantes mais longos, seriam proporcionalmente relacionados ao sucesso, sendo a região anterior de mandíbula, a região de maior disponibilidade óssea para a inserção deste tipo de implantes. Assim, há uma maior taxa de insucesso quando há um pequeno volume ósseo (BERGENDAL; ENGQUIST, 1998; CLEMENTINI et al., 2014; FRIBERG et al., 2005).

Os fatores ósseos estão ligados diretamente a estabilidade do implante, tanto a primária quanto a secundária. O alcance de uma elevada estabilidade primária no ato cirúrgico é essencial para uma osseointegração bem sucedida dos implantes dentários (JAVED et al., 2013). Nota-se que a estabilidade secundária tende a reduzir quando há a indução de micromovimentos durante a fase de cicatrização podendo estes, serem os principais responsáveis pelo fracasso da osseointegração, fazendo com que haja a formação de um tecido fibroso, e assim, induzindo a reabsorção óssea no conjunto osso-implante. Entretanto, quando estes micromovimentos bem controlados e aplicados após o período de cicatrização ou quando se é alcançada uma carga oclusal imediata, estes podem influenciar positivamente a formação e remodelação óssea (JAVED et al., 2013; JAVED; ROMANOS, 2010; ROMANOS et al., 2003).

Entretanto, existem poucos estudos longitudinais que realizem um acompanhamento imediato, após a instalação de implantes dentários e ao decorrer do período de osseointegração, a fim de, mapear o processo de cicatrização dos tecidos peri-implantares. Bem como, não há um consenso de quais parâmetros de

monitoramento da saúde peri-implantar, podem ser usados na prática clínica de forma clara. Nesse sentido, faltam informações de quais seriam os melhores indicadores biológicos da saúde peri-implantar, se estes podem ser usados como diagnóstico precoce do desequilíbrio biológico ainda em fases precoces da cicatrização; e, se os métodos de monitoramento já utilizados são seguros no diagnóstico precoce de alterações peri-implantares.

Amália Machado Bielemann

Métodos de monitoramento de saúde peri-implantar durante o processo de osseointegração

Projeto de Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração em Prótese Dentária).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Faot

Pelotas, 2014

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação da função oral com implantes dentários osseointegráveis tem demonstrado alta previsibilidade e longevidade como opção de tratamento para de pacientes edêntulos totais e parciais (AKSOY; ERATALAY; TOZUM, 2009; BASSI et al., 2013). Entretanto, apesar dessa já ter sido descrita e comprovada em diferentes sítios e tipos ósseos, seu sucesso em termos biológicos é dependente da saúde peri-implantar a qual impacta diretamente na longevidade dos implantes em função (THALJI; NARES; COOPER, 2014).

Para que o processo de osseointegração ocorra com sucesso, é necessária uma resposta da complexa cascata molecular que culminará na remodelação e reparo ósseo. A ação ativa dos osteoblastos e osteoclastos, responsáveis pelo equilíbrio da remodelação e reparo ósseo, é modulada pela liberação de citocinas, proteínas ou peptídeos multifuncionais que atuam como fatores reguladores intercelulares em nível local e sistêmico. Assim, estes marcadores biológicos são importantes na modulação da resposta inflamatória dos tecidos periodontais e peri-implantares tanto nos processos normais quanto nos patológicos (CHANG et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012). O primeiro evento celular na sequência de remodelação é a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Previamente à reabsorção da matriz mineralizada pelos osteoclastos, os osteoblastos/células do periosteio produzem colagenase, removendo a camada osteóide, expondo a matriz mineralizada aos osteoclastos que se tornam ativos em contato direto com a matriz óssea mineralizada (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Durante a dinâmica do processo de osseointegração, nas primeiras duas horas de cicatrização do conjunto osso-implante, há o preenchimento das roscas do implante pelo coágulo sanguíneo em que há a formação de uma rede de fibrina composta por hemácias, neutrófilos e monócitos/macrófagos. Quatro dias após inicia a fase de fibroplastia, caracterizada pelo surgimento de vasos sanguíneos, a migração de leucócitos (realizam a “limpeza da ferida”) e células mesenquimais,

sendo o coágulo substituído por tecido de granulação (ABRAHAMSSON et al., 2004; SCHROEDER et al., 1981). Com a migração contínua das células mesenquimais há a substituição do tecido de granulação por um tecido conjuntivo provisório, o qual é rico em vasos, células mesenquimais, fibras e estruturas vasculares neoformadas. A neoformação óssea já é observada na primeira e segunda semana de cicatrização, por meio de diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos. O osso imaturo neoformado projeta-se na parede lateral do leito ósseo seccionado, e também já pode ser observado na superfície do implante. Na quinta semana o trabeculado de osso imaturo é substituído por osso maduro, o qual sofre posterior remodelação (da sexta à décima segunda semana). Esse processo de remodelação contínua é de fundamental importância para a estabilização dos implantes a longo prazo. Com o implante recebendo cargas mastigatórias, a remodelação do osso mineralizado e funcional ocorre para aumentar a resistência às forças mastigatórias.

Neste microambiente, o monitoramento da saúde peri-implantar é uma rotina que deve ser adotada não apenas após o carregamento oclusal mas sim desde as fases precoces do processo de reparo e remodelação óssea após a etapa cirúrgica. O período de cicatrização óssea representa um processo dinâmico, do ponto de vista ósseo e para se mapear a interface de contato entre osso e implante, a estabilidade primária e secundária podem ser considerados indicadores clínicos da remodelação óssea (CHANG et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012). A estabilidade primária do implante pode ser definida como ausência de mobilidade no estágio cirúrgico e é dependente da qualidade e da quantidade óssea, do desenho do implante e da técnica cirúrgica (DOS SANTOS; ELIAS; CAVALCANTI LIMA, 2011). O alcance da estabilidade secundária representa a primeira fase de osseointegração e compreende um período delicado entre a regeneração e remodelação óssea na região das roscas dos implantes, no qual há o aumento dessa área de contato entre osso-implante (NATALI; CARNIEL; PAVAN, 2009). Durante esta transição, o risco de micro-movimentos do implante e do potencial comprometimento da osseointegração é reforçado (OATES et al., 2007). Pode-se dizer que a estabilidade primária está positivamente associada com a estabilidade secundária, e a extensão da estabilidade do implante também pode depender da condição dos tecidos circundantes (JAVED et al., 2013).

Diferentes métodos clínicos para monitoramento da estabilidade do implante em várias fases de cicatrização têm sido propostos, como por exemplo a análise de frequência de ressonância por meio do sistema Ostell Mentor®. Este sistema envolve a colocação de um “smartpeg” inteligente no interior do implante ou aparafusado ao componente protético para a utilização de um transdutor que é posicionado perpendicular ao “smartpeg” sem contato. O Ostell fornece quociente de estabilidade do implante (ISQ) através da análise de frequência de ressonância numa escala de 1 a 100. Quanto maior for o número ISQ, maior é a estabilidade, e além disso os valores obtidos podem variar conforme o tipo ósseo e diâmetro do implante (QUESADA-GARCIA et al., 2009). Estudos recentes têm mostrado o ISQ é um método preciso, e não invasivo de determinação da estabilidade do implante, e está se tornando um instrumento amplamente utilizado para monitorar as mudanças na rigidez e estabilidade na interface implante-tecido e de discriminar o sucesso de implantes e fracassos clínicos (CAVALLARO; GREENSTEIN; GREENSTEIN, 2009; JAVED et al., 2013; JAVED et al., 2011).

As mudanças normalmente observadas na estabilização do implante ao longo do tempo são reflexos dos eventos biológicos associados com a interface osso-implante, isto é, aumento da estabilidade está relacionado com a formação óssea. A identificação de um ponto de transição de diminuição da estabilidade do implante para posterior aumento da mesma pode ser sugestivo de uma mudança no metabolismo ósseo (OATES et al., 2007).

Do ponto de vista biológico, novos entendimentos têm sido propostos para a melhor compreensão da dinâmica da osseointegração, como por exemplo, o fato de que a osseointegração de um implante parece estar ligada a uma reação de corpo estranho com caráter imunológico-inflamatório desencadeada por adsorção de proteína de superfície, a ativação do complemento, e formação de uma matriz de fibrina, seguidos por recrutamento de granulócitos, células-tronco mesenquimais e monócitos/macrófagos, como último em grande parte, controlando a resposta longo prazo, ainda há a fusão de células gigantes de corpo estranho (TRINDADE et al., 2014). Neste contexto, os mediadores da resposta inflamatória como as interleucinas também desempenham um papel importante nesta etapa, pois modulam a resposta inflamatória dos tecidos periodontais e peri-implantares tanto nos processos normais quanto nos patológicos. Esse mediadores podem ser do tipo

pró-inflamatórios que fazem parte do processo de reparo imediato pós-injúria, tais como a interleucina um beta (IL-1 β), IL-6, IL-12, IL-23, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e anti-inflamatórios que regulam a angiogênese, a remodelação tecidual e a resposta humoral, como a IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (SCHRAUFSTATTER et al., 2012).

Entre essas citocinas citadas, IL-1 β é uma das mais importantes no processo inflamatório na cavidade bucal, pois ela media produção de prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas em vários tipos de células, além de induzir a diferenciação de células precursoras em osteoclastos e a reabsorção óssea, sendo assim um mediador multifuncional que desempenha um papel importante na inflamação periodontal aguda e crônica (MACDONALD; GOWEN, 1993; MUNDY, 1991; TATAKIS; SCHNEEBERGER; DZIAK 1988). Quando associada ao TNF- α , estes mediadores atuam de forma sinérgica, podendo ser considerados potentes estimuladores e inibidores da reabsorção óssea, pois induzem a resposta inflamatória ainda na fase aguda de células ou a agressão tecidual (BERTOLINI et al., 1986; PANAGAKOS et al., 1996). A liberação desses mediadores pode ser potencializada na presença de infecção peri-implantar, e nestes casos são secretados localmente para regular as reações inflamatórias em conjunto com outros fatores de resposta imune local (PANAGAKOS et al., 1996).

Com relação a IL-6, sabe-se que é secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune aguda durante a infecção e após trauma, em especial como dano tecidual que desencadeie a inflamação (KISHIMOTO, 2010). Diferentemente a IL-8 é também conhecida como um potente promotor da angiogênese (KOCH et al., 1992), pois tem como funções primárias a indução da quimiotaxia nas células alvo, ou seja, no sítio da infecção; além de induzir a fagocitose uma vez alcançado o sítio inflamado. Sua secreção tem sido considerada um parâmetro chave na inflamação localizada, pois seu aumento é desencadeado pelo estresse oxidativo nos tecidos, o qual causa o recrutamento de células inflamatórias (KOCH et al., 1992; YAMAMOTO et al., 2006). Em sítios afetados pela doença peri-implantar constantemente encontramos níveis elevados de metaloproteinases 8 e 9 (MMP-8 e 9), quando feito a coleta de amostras de fluido crevicular peri-implantar. Essas MMPs têm como características propriedades destrutivas de tecidos substitutos, afetando tanto tecidos moles como duros, além de

propriedades anti-inflamatórias de proteção e defesa imediatas (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; KNAUPER et al., 1996; MOILANEN et al., 2002). BASEGMEZ e colaboradores, 2012, concluíram que os níveis de MMP-8 no fluido crevicular podem ser úteis para a monitorização da progressão da doença peri-implantar, sendo o aumento dos níveis de MMP-8 um sinal precoce de inflamação (BASEGMEZ et al., 2012).

A IL-10 age no controle da inflamação patológica, devido suas características anti-inflamatórias e aos diferentes mecanismos de supressão dos mediadores inflamatórios (GRUTZ, 2005; HU et al., 2009; SAGAWA et al., 1996). É possível sugerir que IL-10 é também importante na modulação da cascata inflamatória na doença peri-implantar, sendo a sua liberação aumentada (*upregulation*) em grupos de pacientes com doença peri-implantar, representando um esforço para controlar a resposta potencialmente destrutiva em tecidos moles inflamados ao redor dos implantes (DUARTE et al., 2009).

Com a finalidade de monitorar a saúde peri-implantar, exames radiográficos também são realizados para controle da extensão da perda óssea ao redor dos implantes. Universalmente se aceita que a remodelação óssea peri-implantar possa ser de até 2mm durante o primeiro ano de função, seguido por um máximo de 0,2mm por ano (PAPASPYRIDAKOS et al., 2012). Esse critério de sucesso pode ser questionado, pois parâmetros individuais utilizados para esse fim, também podem ser definidos como parâmetros de substituição frequentemente para compensar a falta de resultados primários bem definidos (PAPASPYRIDAKOS et al., 2012).

Entretanto, até o presente momento existem poucos estudos longitudinais de monitoramento de curto e longo prazo de pacientes com vistas a mapear alterações precoces que podem ser visualizadas e diagnosticadas no tecido ósseo peri-implantar. Além disso, dúvidas ainda permanecem com relação a qual seria o melhor método e a melhor forma de se padronizar a rotina de tomadas radiográficas dos pacientes, ELSYAD e SHOUKOUKI (2010), realizaram um acompanhamento longitudinal do nível ósseo peri-implantar em pacientes submetidos ao tratamento com overdentures, por meio de tomada radiográfica periapical com a técnica do paralelismo ao invés de fazer esta avaliação por meio de tomadas de radiografias panorâmicas, como já utilizado em estudos com a mesma população de pacientes (AL-NAWAS et al., 2012; GULJE et al., 2012; QUIRYNEN et al., 2015). Enquanto a

técnica do paralelismo é capaz de eliminar a distorção e os limites de ampliação da imagem, a utilização das radiografias panorâmicas têm várias desvantagens como: má resolução da imagem, imprevisibilidade da distorção da imagem do osso adjacente aos implantes (FREDERIKSEN, 1995), limitação da qualidade da imagem na região anterior de mandíbula devido à sobreposição vértebra cervical e dificuldade de padronização da técnica (GRONDAHL et al., 1996; SATO et al., 1996).

Diante de tantos meios de monitoramento do tecido peri-implantar não menos importante é o acompanhamento clínico da saúde dos tecidos peri-implantares, pois assim como com os dentes naturais, os implantes são suscetíveis a complicações oriundas de trauma ou do desenvolvimento de infecções peri-implantares semelhantes às complicações biológicas que afligem a dentição natural. O acúmulo de biofilme ao redor dos tecidos afeta primariamente a saúde do tecido epitelial, seguido do tecido conjuntivo que envolve o implante e, potencialmente, o osso de suporte subjacente (MISHLER; SHIAU, 2014).

Para padronizar a rotina de diagnóstico do quadro de saúde e doença peri-implantar, um Consenso no ano de 2008 foi publicado no Sexto Workshop Europeu de Periodontia com a proposição de uma definição para as doenças peri-implantares. Para mucosite peri-implantar as características clínicas foram definidas como vermelhidão e edema dos tecidos moles e sangramento à sondagem marginal. Para a peri-implantite foi proposta a observação das seguintes características: profundidade de sondagem aumentada, frequentemente associada à supuração na mucosa, e acompanhada de perda óssea marginal que deve ser superior a 1,5mm no primeiro ano e maior que 0,2mm nos anos subsequentes (ALBREKTSSON; ZARB, 1998; LINDHE; MEYLE; GROUP, 2008). Mais recentemente, no Sétimo Workshop Europeu, no ano de 2011, definiu mucosite peri-implantar como inflamação confinada aos tecidos moles em torno de um implante, enquanto que a peri-implantite pode ser caracterizada por alterações no nível de crista óssea em conjunto com sangramento na sondagem, com ou sem o concomitante aprofundamento da bolsa peri-implantar, sendo a perda óssea progressiva o indicador fundamental para o diagnóstico da peri-implantite (LANG; BERGLUNDH; WORKING GROUP 4 OF SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, 2011).

Portanto, a rotina de monitorar os sinais de vermelhidão e inchaço dos tecidos marginais, sangramento à sondagem, formação de bolsa, e supuração (MOMBELLI et al., 1987), além da textura do tecido mole e cor, mesmo que essa seja dependente da aparência normal dos tecidos receptores antes e após a instalação do implante (LISTGARTEN et al., 1991), pode ser capaz de diagnosticar precocemente e prevenir a instalação da doença peri-implantar.

Diante desses inúmeros métodos de monitoramento da saúde peri-implantar e de avaliar o sucesso clínico da reabilitação com implantes osseointegráveis, há ainda a necessidade de relacionar a evolução e sobrevivência desta intervenção reabilitadora aos parâmetros de ordem imunológica, biológica e morfológica. Neste contexto clínico, a falta de informações quanto os indicadores de prognóstico confiáveis para as avaliações dos tecidos peri-implantares, e o quanto preditivos e correlacionados estão os testes de diagnóstico para a avaliação de destruição ativa do tecido periodontal e peri-implantar desafiam os pesquisadores nas últimas décadas (SALVI; LANG, 2004).

JUSTIFICATIVA

O fenômeno da osseointegração é conhecido há décadas e seu sucesso clínico tem sido descrito independentemente da complexidade de reabilitação oral. Entretanto os mecanismos biológicos, moleculares e imunológicos envolvidos na resposta do osso hospedeiro são ainda pouco discutidos de forma profunda por meio de ensaios clínicos. Atualmente, o conceito de osteoimunologia vem sendo empregado para a compreensão da resposta óssea no período de cicatrização e neoformação óssea.

Entretanto todas essas informações são oriundas ou de estudos animais ou de modelos *in vitro* de cultivo celular. Com a padronização da metodologia de coleta de fluido peri-implantar e com o avanço de técnicas para o mapeamento de interleucinas em condições de pouco volume de fluido obtido é possível se mapear o fenômeno imunológico-inflamatório *in locu*. Este é um dos principais desafios deste estudo clínico, tentar mapear quais são as interleucinas que realmente podem estar envolvidas ativamente no processo de cicatrização inicial e osseointegração dos implantes ao longo de 6 meses pós-operatórios. Além disso, se o processo de doença peri-implantar pode ser diagnosticado precocemente afim de tentar compreender o papel dos mediadores, bem como sua relação, durante o período de desenvolvimento de estabilidade secundária dos implantes.

Por fim, diante do fato que há inúmeros métodos de acompanhamento do sucesso clínico da reabilitação com implantes osseointegráveis, entretanto sem a preconização de uma rotina de monitoramento capaz de diagnosticar sinais clínicos precoces da falha dessa reabilitação, faz-se necessário a proposição de um modelo padrão de monitoramento que possa ser baseado nos eventos biológicos. Assim, supõe-se que o acompanhamento do processo inflamatório por meio de quantificação das citocinas presentes no fluido peri-implantar combinada ao acompanhamento de sinais clínicos e radiológicos, bem como a quantificação da estabilidade entre implante e osso possam gerar uma resposta mais clara para os acontecimentos fisiológicos que geram o sucesso ou perda do implante. Adicionalmente, idealiza-se que a coleta de PICF possa ser introduzida na prática da clínica odontológica para o monitoramento da saúde peri-implantar, sendo um exame laboratorial de rotina, utilizado para controle e diagnóstico precoce das alterações biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo longitudinal de curta duração de 6 meses será monitorar os tecidos peri-implantares durante o processo de cicatrização e ao longo do processo de osseointegração através de análise clínica e radiográfica, da quantificação de citocinas pró-inflamatórias e mapeamento da estabilidade dos implantes em pacientes desdentados mandibulares após a reabilitação com “overdentures” implantosuportadas.

3.2 Objetivos Específicos

- Monitorar clinicamente a cicatrização dos tecidos peri-implantares durante 6 meses pós-operatórios através da análise dos seguintes parâmetros: índice de placa, inflamação do tecido peri-implantar, profundidade e sangramento a sondagem;
- Avaliar o nível ósseo peri-implantar através de exame radiográfico periapical e panorâmico;
- Quantificar os níveis de citocinas como, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MMP-8 e MMP-9; através do ensaio imunoenzimático (Elisa).
- Avaliar a estabilidade primária e secundária dos implantes por meio de análise de frequência de ressonância nos seguintes intervalos: “baseline” (T0 – instalação), e 7, 15, 30, 90 e 180 dias pós-operatórios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Este é um estudo clínico longitudinal com 180 dias de acompanhamento de intervenção que preconizará a avaliação do processo de osseointegração dos implantes dentários e o monitoramento da saúde peri-implantar. As variáveis de desfecho serão: parâmetros clínicos preditores de saúde peri-implantar, perda óssea marginal, liberação de mediadores inflamatórios no fluido peri-implantar e estabilidade primária e secundária dos implantes.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto já está aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (FO-UFPel) sob o N^o 69/2013. Os participantes serão informados quanto à natureza e objetivos deste estudo pelos pesquisadores durante a primeira consulta clínica. Os pacientes terão liberdade de não aceitarem participar do estudo e, em caso de concordância com as especificações, assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice).

4.3 Seleção dos participantes

Este estudo objetivará recrutar 30 indivíduos desdentados totais de ambos os sexos, sem limitações de idade, que apresentem necessidade de reabilitação oral do tipo overdentures mandibular retidas em 2 implantes osseointegráveis de pequeno diâmetro (Facility, 2.9x10mm, Neodent) na região anterior de mandíbula. Estes pacientes serão reabilitados proteticamente após 3 meses da osseointegração (carregamento convencional) por meio de overdentures utilizando componentes protéticos não-esplintados (Sistema Equator, Neodent).

Para serem incluídos na pesquisa os pacientes deverão preencher os seguintes critérios de inclusão: apresentar boa saúde geral e estar classificado de acordo com a Sociedade Americana de Anestesia, em ASA I (sem distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou psiquiátricos); não serem portadores de desordens sistêmicas que predisponham a infecções; se do sexo feminino, não estarem grávidas ou lactantes; ter disponibilidade de comparecer a FO/UFPel nos dias pré-determinados.

Serão excluídos da amostra pacientes que apresentem impossibilidade clínica local e sistêmica para o tratamento cirúrgico com implantes dentários como presença de lesões intra-ósseas e infecções, pacientes diabéticos não-controlados, cardiopatas ou hipertensos descompensados.

4.4 Cálculo Amostral

O cálculo amostral está baseado em estudos clínicos longitudinais prévios com objetivo similar de comparar a performance clínica e saúde periimplantar de overdentures ou próteses do tipo protocolo mandibulares pela quantificação de citocinas pró-inflamatórias, análise da estabilidade do implante e pela análise radiográfica da perda óssea peri-implantar. O número de pacientes recrutados para este tipo de ensaio clínico segundo vários estudos na literatura varia de 6 (SCHIERANO et al., 2000) a 36 pacientes (ALSABEEHA et al., 2010; ELSYAD; ELSAIH; KHAIRALLAH, 2014). Assim sendo, o número de pacientes que se pretende recrutar encontra-se dentro da média estimada de estudos anteriores.

Também quanto o número de implantes a ser instalados neste estudo encontra-se dentro do número mínimo observado na literatura de 18 implantes (SCHIERANO et al., 2000), o número máximo de 110 implantes (FONSECA et al., 2014) já foram instalados em estudos prévios com desfechos clínicos similares.

Baseando-se nos estudos selecionados um total de 313 pacientes foram avaliados. Para a quantificação de citocinas inflamatórias uma média de 16,3 pacientes por estudo e 49,7 implantes foram avaliados. Para análise radiográfica a média de pacientes avaliados foi de 28,25 e a de implantes 59,5. Para estabilidade de implantes uma média de 25,5 pacientes foram avaliados, com 61,5 implantes mensurados. Considerando análises para quantificação de citocinas os estudos utilizados para esta finalidade e os dados citados podem ser observados na Tabela 1.

[Digite texto]

Tabela 1. Estudos que fundamentam o cálculo amostral para análise de citocinas pro-inflamatórias, estabilidade primária e análise radiográfica.

Estudo Autor/Ano	Título/ Revista	População	Idade média (anos)	Nº de implante s	Reabilitação Oral	Tipo de Implante	Citocinas	Estabilidade Primária / Secundária (Sim/Não)	Análise Radiográfica (Sim/Não)	Follow-up
Fonseca et al., 2014 (FONSECA et al., 2014)	Cytokines expression in saliva and peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant disease. Clin Oral Implants Res.	22 pacientes Mulheres:16 Homens: 6	62.5 ± 10.7	110	Protocolo: 5 implantes	Neodent HE: Plataforma regular	IL-1β; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12; IFN-γ and TNF-α	Não	Não	6 meses Carregamento funcional: 3,1± 2,4 anos
Boynueğri et al., 2012 (BOYNUEGRI et al., 2012)	Significance of keratinized mucosa around dental implants: a prospective comparative study. Clin Oral Implants Res.	15 edentulos Mulheres:8 Homens:7	54 ±10	60	Overdenture Sistema barra 4 implantes	Straumann® SLA: 4,1x10 mm	IL-1 β e TNF-α	Não	Não	3, 6 e 12 meses
Lachmann et al., 2007 (LACHMANN, S.; KIMMERLE-MULLER, E.; AXMANN, D.; GOMEZ-ROMAN, G.; et al., 2007)	Reliability of findings around healthy implants in association with oral hygiene measures: a clinical, microbiological, and immunological follow-up in edentulous patients. Clin Oral Implants Res.	21 edentulos Mulheres:14 Homens:7	67	42	Overdenture 5- Sistema bola (2 imp) 16 Sistema barra-clip (2 imp)	ITI Bonefit: 4 Branemark:2 implantes Frialit-2: 9 IMZ:6 Ledermann TPS: 2	IL-1 β, Pls Tipo 2 Pg E2	Sim	Não	3 meses
Lachmann et al., 2007	Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of	24 edentulos	66	48	Overdenture 06- Sistema	Frialit-2	IL-1 β	Não	Não	Duas coletas com uma

[Digite texto]

(LACHMANN, S.; KIMMERLE-MULLER, E.; AXMANN, D.; SCHEIDELER, L.; et al., 2007)	crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B +3954 genotype. A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis Clin Oral Implants Res.				bola (2 imp)	IMZ fixtures					semana de intervalo.
					18- Sistema barra-clip	standard-type Bonefit					
					(2 imp)	Branemark					
						Tuebingen Al2O3 implants					
						Ledermann TPS					
Lachmann et al., 2007 (LACHMANN, STEFAN et al., 2007)	A comparison of implant-supported, bar- or ball-retained mandibular overdentures: a retrospective clinical, microbiologic, and immunologic study of 10 edentulous patients attending a recall visit. Int J Prosthodont.	10 edentulos Mulheres:2 Homens:8	72	20	Overdenture	Bonefit, Institut Straumann	IL-1β	Não	Não		Coletas: avaliação controle, 7dias, 15 dias.
					5- Sistema bola (2 imp)	Branemark, Nobel Biocare					
					5 Sistema barra-clip	Frialit-2					
					(2 imp)	Friadent					
						IMZ					
Schierano et al., 2000 (SCHIERANO et al., 2000)	Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. J Dent Res.	6 edentulos Mulheres:5 Homens:1	61.4	18	Overdenture	Branemark	IL-6, IL-8, TNF-α, IL-1β, GM-CSF, TGF-β1	Não	Não		Pós a segunda etapa cirúrgica e 4, 8 e 12 meses após a fixação da prótese.
					Sistema bola - 3 implantes	diâmetro: 3,75-4mm; comprimento: 10 a 15 mm					
Sćepanović et	Immediately loaded mini dental implants as overdenture retainers: 1-Year cohort	30 edentulos	45 - 63	120	Overdenture	MDI- 3M ESPE:	Não	Sim	Sim		Pós-operatório, 3
					Sistema bola -						

[Digite texto]

al., 2014 (SCEPANOVIC et al., 2015)	study of implant stability and peri-implant marginal bone level. Ann Anat	Mulheres:16 Homens:14				4 implantes	13 mm x 1.8mm					e 6 semanas, 4º, 6º e 12º mês
da Silva et al., 2012 (DA SILVA et al., 2012)	Resonance frequency analysis of overdenture retainer implants with immediate loading. Gerodontology.	16 edentulos Mulheres:10 Homens:6	47.4 (40 - 67)	32		Overdenture Sistema bola 2 implantes	Implantes cilíndrico HE (Titamax, Neodent): 4 mm x 9,11,13 e 15 mm.	Não	Sim	Não		Pós-operatório, 3 e 15 meses após a instalação
Alsabeeha et al., 2010 (ALSABEEHA et al., 2010)	Primary stability measurements of single implants in the midline of the edentulous mandible for overdentures. Clin Oral Implants Res.	36 edentulos Mulheres:24 Homens:12	68 (53-85)	36		Overdenture – Sistema bola 1 implante	Southern - Diâmetro largo: 8mm Neoss – Diâmetro regular: 4mm Southern - Diâmetro regular: 3.75mm	Não	Sim	Não		Uma análise pós-cirúrgica
Oates et al., 2007 (OATES et al., 2007)	Enhanced implant stability with a chemically modified SLA surface: a randomized pilot study. Int J Oral Maxillofac Implants.	31pacientes Mulheres: 22 Homens: 9	-	50 implantes em mandibula		Unitários	Implantes SLA e SLActive	Não	Sim	Não		0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas após instalação.
Preoteasa et al., 2014 (PREOTEASA; IMRE;	A 3-Year Follow-up Study of Overdentures Retained by Mini-Dental Implants. Int J Oral Maxillofac Implants.	16 edentulos mandibulares Mulheres:13	62 (52 - 76)	74		Ovedentures (n=16)	Mini-implante IMCTEC/3M-ESPE	Não	Não	Sim		3 anos

[Digite texto]

PREOTEASA, 2014)		Homens:10										
Elsyad et al., 2014 (ELSYAD et al., 2014)	Marginal bone resorption around immediate and delayed loaded implants supporting a locator-retained mandibular overdenture. A 1-year randomised controlled trial. J Oral Rehabil.	36 edentulos Mulheres:16 Homens:20	59,6	72	Overdenture Sistema Locator 2 implantes	Tiologic- Implants	Não	Sim	Sim	1 ano		
Zancope et al., 2014 (ZANCOPE et al., 2014)	Immediate loading implants with mandibular overdenture: a 48-month prospective follow-up study. Brazilian Oral Research	20 pacientes	62	40	Overdenture Sistema barra-clip 2 implantes		Não	Não	Sim	48 meses		
Elsyad et al, 2010 (ELSYAD; SHOUKOUKI, 2010)	Resilient liner vs. clip attachment effect on peri-implant tissues of bar-implant-retained mandibular overdenture: a 1-year clinical and radiographical study. Clin Oral Implants Res.	30 pacientes do sexo masculino	62.5	60	Overdenture- Sistema barra-clip e bola 2 implantes	Zimmer Inc	Não	Não	Sim	12 meses		

4.5 Avaliação das citocinas presentes no fluído peri-implantar

Para coleta do fluído crevicular peri-implantar serão utilizadas tiras de papel absorvente estéril (Periopaper ®, Oraflow Incorporated, Amityville, Nova Iorque, EUA), a qual serão realizadas nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias. A tira de papel será inserida no sulco peri-implantar cerca de 1 mm na face mesio-vestibular e permanecerá por 60 segundos. Após 90 segundos uma nova tira de papel será inserida na face disto-vestibular e permanecerá por 60 segundos. As tiras serão armazenadas em um criotubo contendo 100mL de PBS (tampão fosfato salino, Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, EUA), e congelado a -80°C até a análise laboratorial.

Os níveis de citocinas como interleucina 1 beta (IL β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a metaloproteinase 8 e 9 (MMP-8 e MMP-9) serão quantificados através do ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA), utilizando DuoSet kits (R&D systems, Mineapolis MN, EUA).

Placas de microtitulação de 96 poços (Corning Costar, Cambridge, MA) serão sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IL-1 β , anti-TNF- α ou anti-PGE₂ de camundongo (100 μ L/ poço) de acordo com a recomendação do fabricante.

As placas serão mantidas *overnight* (mínimo de 12 horas) em temperatura ambiente, em seguida, lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem (PBS 0.05% de Tween 20) e bloqueadas com 300 μ L de solução tampão de bloqueio/poço (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Após, as placas serão novamente lavadas três vezes com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L dos padrões de citocinas inflamatórias com concentrações conhecidas (curva padrão) e 20 μ L de fluído crevicular durante 2 horas em temperatura ambiente. Testes serão realizados em triplicata.

Em seguida, as placas serão lavadas 3 vezes com solução tampão de lavagem e incubadas com 100 μ L de anticorpos de detecção anti-IL-1 β , anti-TNF- α ou anti-PGE₂ marcados com biotina. As placas serão mantidas por 2 horas em temperatura ambiente e novamente lavadas. Após a lavagem, serão acrescentados 100 μ L de estreptavidina conjugada a peroxidase de rábano (horseradish peroxidase - HRP) em cada poço e protegidas contra luz utilizando papel alumínio durante 20 minutos.

Uma nova lavagem será realizada e a reação revelada utilizando 100µL de solução contendo substrato cromogênico a base de tetrametilbenzeno e peróxido de hidrogênio em cada poço, e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente protegido de luz. Em seguida, serão adicionados 50µL do reagente de parada em cada poço ($2\text{NH}_2\text{SO}_4$). A densidade óptica (DO) de cada poço será imediatamente determinada em leitor de microplacas (Elx800, BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT, USA) com comprimento de onda de 405nm.

4.6 Avaliação da estabilidade do implante por análise de frequência de ressonância

A estabilidade dos implantes será mensurada por meio do coeficiente de estabilidade do implante (ISQ) obtido pelo aparelho Osstell[®] (IntegrationDiagnostics AB, Gothenburg, Suécia) em que uma “smartpeg” será conectado ao componente protético e por meios desse a leitura será realizada. Um único operador, calibrado, executará todas as mensurações em triplicata para as faces mesial, distal, vestibular e lingual de cada implante, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante do aparelho.



Figura 1. Demonstração da utilização do aparelho Osstell Mentor.

4.7 Avaliação do nível ósseo Peri-implantar

Serão realizadas radiografias panorâmicas padronizadas no pós-operatório (mediato) e 6 meses após a cirurgia para análise do nível ósseo peri-implantar. As imagens serão analisadas através do software de medições lineares (DBSWin - Sistema digital VistaScan), e a borda externa da cabeça do implante será utilizada como referência para avaliação do nível ósseo peri-implantar (AL-NAWAS et al., 2012; GULJE et al., 2012; QUIRYNEN et al., 2015).

Também serão confeccionadas radiografias digitais do tipo interproximais, da região operada, sendo essas feitas pela técnica do paralelismo com o uso de posicionadores tipo RINN (Dentsply) segundo a técnica descrita por BRAGA et al. (2011).

Cada paciente terá um posicionador de resina acrílica autopolimerizável individualizado para padronização da técnica, este será confeccionado usando os dentes antagonistas como ponto de referência seguindo a metodologia proposta por BRAGA et al. (2011).

4.8 Exame clínico Peri-implantar.

Exames clínicos de profundidade de sondagem peri-implantar, índice de placa, índice de sangramento à sondagem e do grau de inflamação peri-implantar serão realizados nos períodos de 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias. As mensurações serão realizadas nas quatro faces (mesial, distal, vestibular e lingual) do implante com o auxílio de uma sonda periodontal milimetrada (AL-NAWAS et al., 2012; GULJE et al., 2012; QUIRYNEN et al., 2015).

O índice de placa será classificado como: 0 (sem detecção de placa), 1 (placa detectada através da utilização de uma sonda), 2 (placa visível), 3 (placa em quantidade abundante), a presença de cálculo será classificada como 1 e a ausência como 0. O grau de inflamação peri-implantar será classificado como: 0 (mucosa peri-implantar normal), 1 (inflamação leve, pouca mudança de cor e leve edema), 2 (inflamação moderada, vermelhidão, edema e brilho), 3 (inflamação grave, vermelhidão marcada, edema e ulceração). O índice de sangramento será classificado como: 0 (sem sangramento a sondagem), 1 (pontos isolados de sangramento visível), 2 (uma linha vermelha confluyente de sangue ao longo da margem da mucosa), 3 (sangramento intenso ou abundante). A profundidade de

sondagem será caracterizada pela distância entre a borda marginal da mucosa e a ponta da sonda (GULJE et al., 2012; MOMBELLI et al., 1987).

4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos serão tabulados no programa estatístico Stata® (Versão 11.2, StataCorp LP, CollegeStation, Texas, EUA). O método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes será considerado estatisticamente significativo o valor $p < 0,05$.

4. Orçamento

Material	Valor Unitário (R\$)	Quantidade	Total (R\$)
MilliplexCatalogID.HCYTOMAG-60K- 06.Hum- IL-1alfa, IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, VEG – com serviço de análise	7.685,91	4	30743,64
MilliplexCatalogID.HMMP2MAG-55K- 05.H - MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP- 9, MMP-10 – com serviço de análise	6.777,65	4	27110,6
Tubo criogênico	100,00	1	100,00
PBS pH 7,2 10x concentrado 500ml, Gibco®	300,00	1	300,00
Ponteira amarela 0-200µL c/ 1000	8,00	1	8,00
Placa com tampa, fundo chato 96 poços	4,40	10	440,00
Pontas de papel absorvente Periopaper®	440,00	1	440,00
Luva (caixa)	21,00	4	84,00
Máscaras (pacote)	10,00	1	10,00
Gorros (pacote)	8,00	1	8,00
Anestésico Local (caixa)	50,00	2	100,00
Lâmina de Bisturi nº 15 (caixa)	150,00	1	150,00
Agulha gengival (caixa)	40,00	1	40,00
Seringas 20 ml descartáveis com agulha (caixa)	150,00	1	150,00
Soro fisiológico 250 ml	200,00	1	200,00
Smartpegs	180,00	6	1080,00
Resina Acrilica (polímero)	26,00	1	26,00
Resina Acrilica (monomero)	23,00	1	23,00
TOTAL			61013,24

RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Nesta seção estão relatadas as complementações e alterações baseadas no Projeto de Pesquisa o qual foi aprovado pelo exame de qualificação em 18 de novembro de 2014. A execução deste estudo clínico de curta duração seguiu a metodologia previamente descrita, entretanto o período de acompanhamento selecionado para a redação do artigo para defesa da dissertação compreendeu somente os 3 meses ao invés de 6 meses. Assim apenas o monitoramento do período de cicatrização dos tecidos peri-implantares e leito ósseo foi descrito de ponto de vista morfológico e biológico. Outra modificação foi que foram executadas a quantificação de apenas quatro citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . A quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-8, MMP-8 e MMP-9 não foram realizadas em virtude da indisponibilidade de volume de fluido peri-implantar coletado dos pacientes, devido à falta de recursos financeiros para compra de kits específicos para dosagem de um espectro mais abrangente de citocinas baseada em baixos volumes.

Este estudo gerou a redação de um artigo científico intitulado: “*A comparison between inflammation-related markers in the peri-implant crevicular fluid and clinical parameters during osseointegration in edentulous jaws*”, que abrangeu em seus resultados os eventos clínicos e biológicos do processo de cicatrização após instalação de implantes dentários de diâmetro estreito na região anterior de mandíbulas edêntula. O monitoramento da cicatrização dos tecidos peri-implantares e a cinética de liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias até a osseointegração dos implantes é apresentado. A avaliação do nível ósseo peri-implantar só pode ser realizado pelo exame radiográfico panorâmico, pois limitações impostas pela altura do assoalho lingual associada à atrofia óssea mandibular dos pacientes desdentado totais selecionados inviabilizaram o posicionamento adequado e padronizado de películas para o acompanhamento com radiografias peri-apicais.

Quanto a avaliação da estabilidade dos implantes por meio de ISQ, os resultados demonstraram que os valores obtidos na estabilidade primária não foram mantidos durante o período de osseointegração. Entretanto mesmo ocorrendo uma diminuição significativa nas médias da estabilidade secundária a partir dos 30 dias

de cicatrização, os implantes se mantiveram estáveis e ao fim do período de acompanhamento apresentaram-se clinicamente osseointegrados.

A quantificação dos biomarcadores inflamatórios, apresentou níveis variados para a liberação TNF- α , porém um dado relevante foi que a sua maior liberação ocorreu no período de 15 a 30 dias; sendo a liberação significativa em pacientes com atrofia óssea mandibular. A liberação de IL-1 β foi mais elevada nos períodos precoces de cicatrização, revelando não ser um potente marcador de mudanças no processo de inflamação em pacientes saudáveis. A IL-6 seguiu um padrão de liberação conhecido, porém ao fim do processo de cicatrização sua concentração significativamente elevada pode ser relacionada a presença de eventos de traumáticos. Por fim, as concentrações de IL-10 aumentaram significativamente ao longo do tempo, mostrando esta ser um importante biomarcador para o monitoramento dos tecidos peri-implantares principalmente relacionada à obtenção e manutenção da homeostasia do tecido ósseo em pacientes desdentados totais.

ARTIGO

A comparison between inflammation-related markers in the peri-implant crevicular fluid and clinical parameters during osseointegration in edentulous jaws

Amália Machado Bielemann*, AM; Raissa Micaella Marcello-Machado†; Frederico Canato Martinho‡, Fábio Renato Mazolli Leite§; Otacílio Luis Chagas-Junior ||; Altair Antoninha Del Bel Cury¶; Fernanda Faot,#

* MSc, PhD student, Dental School, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Msc student, Program in Prosthodontics, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brasil

† Post-doctoral student, Department of Prosthodontics and Periodontology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil

‡ Professor, Department of Restorative Dentistry, Endodontics, State University of São Paulo, School of Dentistry, São José dos Campos, Brazil

§ Professor, Department of Semiology and Clinics, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Brazil

|| Professor, Department of Surgery, Traumatology and Prosthetics Oral and Maxillofacial, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Brazil

¶ Professor, Department of Prosthodontics and Periodontology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brasil

Professor, Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Brazil

Corresponding author: Amália M Bielemann, Federal University of Pelotas, Gonçalves Chaves Street 457, 96015-560, Pelotas, RS, Brazil.

Phone/Fax: +55 53 3225 6741.

Email: amaliamb@gmail.com

& Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Periodontology

Abstract

Purpose: To investigate the association between clinical parameters, implant stability and cytokine levels in peri-implant crevicular fluid (PICF) during early bone healing after implant placement.

Materials and Methods: Sixty narrow implants were placed in mandible anterior region of 30 edentulous patients (67.23 ± 7.66 years). Bone type, insertion torque and primary stability were registered during surgery. Clinical measurements of peri-implant health were recorded, gingival index (GI), plaque index (PI) and probing depth (PD). Samples from the peri-implant crevicular fluid (PICF) were collected 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after surgery and analyzed for IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α levels. Implant stability was assessed by resonance frequency measurements (RFA). Data was analyzed on patient level implying that the mean over all implants by patient was used as the statistical unit.

Results: Mean time of edentulism in the mandible was 24.53 (± 13.29) years and mandibular bone atrophy was diagnosed in 15 patients. A total of 12 implants failed at different periods of osseointegration. In healthy implants, the GI displayed significantly different outcomes between the first week the following period ($p = 0.05$). Significant increasing in the PI was observed only between the weeks 4 to 8 and 8 to 12. Significant differences in PD were observed at all time intervals. The implant stability quotient reduced significantly over time after the 4th week. The highest levels of TNF- α were recorded at 2 weeks (non-atrophic patients) and 4 weeks (atrophic patients), after which the concentrations declined ($p < 0.05$). Patients with bone atrophy had significantly higher TNF- α levels in weeks 4 and 8, compared to their non-atrophic counterparts. IL-1 β concentrations increased only after 12 weeks ($p = 0.003$), and IL-1 β levels were significantly higher for patients with atrophy during the first two weeks. IL-6 concentrations peaked in the first week ($p < 0.05$; $p = 0.005$) and were significantly higher for patients with bone atrophy in weeks 1, 2 and 4. IL-10 concentrations progressively increased over time, with the highest concentration in the 12th week ($p < 0.005$). Smoking, bone atrophy and bone type seems differently influence the cytokines concentrations during the healing time.

Conclusion: Although, the critical period to PI and GI were weeks 1 and 2, PD stabilized at week 8 and ISQ values decrease from week 4. The variations in the cytokine concentrations and their predominant role can be attributed to healing balance in different periods of time, and the cytokines may interact synergistically

with each other, be influenced by the clinical parameters and population characteristics. Bone type, smoking habits and bone atrophy can change and affected the osseointegration process. Was necessary more analyses to understanding the normally cytokines concentrations.

Keywords: Biological Markers; Cytokines; Dental Implant; Osseointegration; Wound Healing

INTRODUCTION

The widely used parameters to determine dental implants success are usually not based on direct information from the peri-implant site. Instead, most studies report peri-implant soft tissue characteristics, implant level, prosthesis condition, and patient's subjective evaluation.¹ However, some of these parameters are not easy to assess and interpret and might not be sensitive or specific to distinguish disease onset, activity and risk rate.²

Osseointegration depends on the osteogenesis at implant interface, a dynamic process resulting from a complex set of inflammation-related reactions, such as bone resorption and apposition, angiogenesis and neurogenesis.^{3, 4} Once the implant is detected by the body, an immune-mediated foreign body reaction (FBR) activates several key biological processes, such as signaling pathways and transcription factors activation, cell growth and differentiation, cytokines and growth factors secretion.⁴

Inflammation occurrence and resolution involve active well-engaged biochemical processes to return tissues to homeostasis and implant osseointegration. Most of the interaction between immune system cells is biomodulated by cytokines, growth factors and hormones. Cytokines can be roughly categorized into Th1- and Th2-type profiles. Th1-type is involved in cell-mediated pro-inflammatory reactions, activates cytotoxic, inflammatory and immediate repair functions. Members include interleukin (IL)-1beta (IL-1 β), IL-6, IL-12, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). The Th2-type profile induces antibody production, regulate angiogenesis, tissue remodeling and humoral response. This Th2-type is mainly characterized by and anti-inflammatory role carried out by IL-10, transforming growth factor beta (TGF- β), among others.^{5, 6}

Understanding interleukin mechanisms in biological processes can enable monitoring implant success and survival. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine involved in several biologic processes, including immune regulation, inflammation, connective tissue metabolism, stimulate the formation and maturation of osteoclasts from osteoprogenitors, and the activation of mature multinucleated osteoclasts to resorb bone and inhibit bone formation.^{7, 8} IL-1 β levels around peri-implantitis lesions were also shown to be positively correlated with the amount of gingival inflammation,

indicating it may be a reliable marker to detect early signs of peri-implant mucositis before they progress to peri-implantitis.^{7, 9-11}

Synergistically, tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates bone resorption, prostaglandin synthesis and protease production by many cell types including fibroblasts and osteoblasts.⁷ TNF- α 's rapid synthesis and early release activate and recruit other cells to sites of microbial invasion and infection. It has been detected in very low levels from sites with periodontitis since excessive secretion of TNF- α in acute or chronic inflammatory disease is a significant clinical problem.^{12, 13}

Both IL-1 β and TNF- α can regulate IL-6 levels,¹⁴ a multifunctional cytokine that stimulates immune responses, hematopoiesis and acute-phase reactions, including B-cell growth, T-cell activation, and platelet production. The de-regulation of IL-6 production has been implicated in the pathogenesis of a variety of several chronic inflammatory proliferative diseases.^{14, 15}

One crucial regulator of the pro-inflammatory process is interleukin-10 (IL-10). It downregulates synthesis of Th1 pro-inflammatory cytokines and prevents excessive inflammation by acting on macrophages.¹⁶ IL-10 is a B cell stimulator, enhancing B cell proliferation and differentiation, suggesting that IL-10 can play important roles in the regulation of cellular and humoral immune responses.^{16, 17}

However, while cytokines are essential for the activation, differentiation and control of the osseointegration process, they are currently not used to monitor peri-implant health status, because their basal levels are still unknown. Currently, the only accurate and non-invasive diagnostic tool available to provide information about the osseointegration is the implant stability quotient (ISQ), which is determined by resonance frequency analysis (RFA). This data is solely based on changes in the rigidity and stability of the implant-tissue interface over the time and is extensively used to determine the implant success and diagnose early and late failures.^{18, 19} However, as this measure gives the contact quotient between the bone-implant interface (i.e., increased stability is related to bone formation), it is difficult to identify a transition point that indicates a fault.²⁰

Understanding the biomarkers roles at healing process can allow in the future the dentist perform peri-implant fluid collection during their clinical practice in order to check-up and/or diagnosis of the dental implants health status. Thus, the aim of this study is to assess the association between periodontal clinical parameters (plaque index, calculus, gingival index, pocket depth, bleeding on probing) and implant

stability with different cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid (PICF) during the bone healing process after implant placement in edentulous patients. In addition, we aim to investigate the influence of bone atrophy, bone type, insertion torque and smoking during healing on implant osseointegration.

MATERIALS AND METHODS

The population of this prospective longitudinal clinical trial was recruited from the patients referred to the School of Dentistry of the Federal University of Pelotas - Brazil between June 2014 and June 2015. Inclusion criteria were: upper and lower totally edentulous patients with clinical atrophic, evaluation for at least 3 years, associated with reduced stability and insufficient retention of the mandibular denture. Patients had to present no history of previously inserted oral implants and radiotherapy in the head or neck region and with no systemic health problems that might affect the healing process. Subjects were excluded from the study if clinically unsuited for surgery or for rehabilitation with dental implants, pregnant or lactating.

The study was approved by the institutional Committed Ethics board for human subjects (protocol 1.267.086). Forty subjects were invited to participate in the research and informed about the treatment proposed as well as the associated risks. After recruitment, 30 patients accepted to participate and signed an informed consent term.

Digital panoramic radiographs were performed (Rotograph Plus, Del Medical Imaging Corp., USA) and linear measurements related to morphology and mandibular height were performed in DBSWIN software 4.5 (Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen, Germany) by a single calibrated examiner according to the methodology described by Xie et al.²¹

The following mandibular bone parameters were measured: mandibular body length, height in the anterior (midline) and posterior (molar region), and superior height of the foramina (distance from the top edge of the mentonian foramen to the alveolar ridge). Based on these parameters, patients were classified as atrophic when their ridge height was below 25 mm in the anterior region and below 16 mm in the posterior region, according to the classification described by Cawood & Howell²². Each patient subsequently received two dental implants in the interforaminal region (ø 2.9 - 10mm Facility, Neodent Osseointegrated Implants, Curitiba, Brazil).

Surgical and post-operative protocol

Dental implants were placed using a traditional single-stage surgical protocol performed by an experienced surgeon. Anesthesia was administrated locally and bilaterally in the anterior mandibular area. Afterwards, full-thickness flaps were reflected and osteotomies were prepared 5mm anterior to the mental foramina. Two

dental implants were inserted in the prepared sites respecting an inter-implant distance of 20mm. Surgical sequence followed the protocol described by the implant manufacturer. Bone type and implant insertion torque were recorded during osteotomies and implant insertion. The mucoperiosteal flaps were adapted around implant neck to allow non-submerged healing. A gingival former healing cap was placed for all implants and the mandibular prosthesis was adjusted and an intermediate liner (Trusoft, Bossworth Company, USA) applied to fitting surface till the end of the bone healing period. Mandibular overdentures were conventionally loaded after 3 months.

Postoperative medication included amoxicillin 500mg three times a day during 7 days, ibuprofen 600mg three times a day during 3 days, paracetamol 500mg four times a day as needed. Silk sutures were removed 10 days after surgery. Complete denture care instructions were provided to all patients and reinforced in each follow-up.

Implant Stability Analysis

The implant stability quotient (ISQ) was determined by RFA using Osstell® (Integration Diagnostics AB, Göteborg, Sweden). A Smartpeg™ was inserted manually into the internal connection of the healing cap and the RFA value was measured from four different directions (mesial, distal, buccal and lingual). Measurements were performed at implant placement (baseline) and 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after implant placement. Analyses were made in triplicate by the same examiner (AMB).

Clinical Monitoring and Data Sample Collection

Patients were submitted to clinical assessments after implant installation and peri-implant crevicular fluid (PICF) samples collection. Clinical parameters of the dental implant sites were evaluated by assessing the plaque index (PI) score, presence of calculus, probing depth (PD), bleeding on probing index (BOP)²³ and the gingival index (GI) score. The GI score was as follows: 0 - normal peri-implant mucosa; 1 - mild inflammation, slight change in color, slight edema; 2 - moderate inflammation, redness, edema, and glazing; 3 - severe inflammation, marked redness, edema, and ulceration²³. All measurements were performed at 4 sites around each implant (mesial, distal, buccal and lingual) using a periodontal

Goldman/Fox Williams probe in millimeters at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks post implantation. PD and BOP were not assessed before the first week. Panoramic radiographs with standardized settings were taken at the implant surgery and abutment connection. Digital images were analyzed by an independent investigator and calibrated examiner (RMMM), according to the methodology described by Al-Nawas et al.²⁴ to measure the bone-level changes.

PICF collection and analysis

Crevicular fluid was collected around implant using standardized paper strips (Periopaper™, Proflow, Amityville, NY, EUA) at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks post implantation. Supragingival plaque was removed, each implant was dried for 10 seconds with compressed air and isolated from saliva with a cotton roll. Two paperstrips were inserted separately for 40 seconds at the mesial and the distal surface of each implant. Paperstrips were placed in a single Eppendorf containing 100µl phosphate-buffered saline and stored at -80°C. Interleukin (IL-)1 beta (IL-1β), IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits in accordance with the manufacturer's (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). All analyzes were performed by a blinded technician.

Statistical Analyses

Sample size was based on previous investigations that found differences in the concentration of biological markers present in the PICF and clinical parameters used to assess the peri-implant health, based on this twenty-four patients and/or fifty-seven implants was necessary.²⁵⁻²⁷ To investigate the clinical performance of dental implants, data related to smoking habits, bone atrophy presence, bone type, insertion torque (high or low) and clinical status of the peri-implant tissue were dichotomized. Analyses were performed using One-way ANOVA. The differences in ISQ measurements at each time point were calculated using paired *t* tests. Cytokine levels at different times of sampling (1, 2, 4, 8 and 12 weeks) were compared using Wilcoxon matched pairs signed-rank test.

RESULTS

Sixty implants were placed in thirty fully edentulous patients (10 males and 20 females; age range 49 to 89 years). Mean edentulism time was 24.53 ± 13.29 years, bone height in the anterior region was 23.42 ± 3.78 mm, mandibular bone atrophy was diagnosed in thirteen patients, and five subjects were smokers. Twenty implants were inserted in type 1 bone and forty implants in bone type 2; insertion torque was above 32N for thirty-three implants. Population demographic characteristics are presented in Table 1. At least 2 mm of keratinized mucosa was present around the implants (data not shown) and no radiographic changes in bone levels were noted.

Peri-implant Tissue and Stability Monitoring

Plaque index (PI) showed statistically significant reduction from the 4 to 8 and from the 8 to 12 week. Gingival index (GI) significantly reduced from the first to the last week. Probing depth (PD) statistically decreased between 4 and 8 weeks ($p < 0.001$). Bleeding on probing (BOP) was stable throughout the experiment ($p > 0.05$; Table. 2).

A significant decrease in ISQ's was seen after 4 weeks compared to the baseline measures ($p \leq 0.05$). This effect was more pronounced around implants with gingival inflammation signs after the 1st and 2nd weeks of healing ($p = 0.002$; $p = 0.05$).

Cytokine Analysis

Mean and standard deviation of cytokine concentrations in the PICF at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after implant installation are shown in Table 3. Comparative statistics of clinical parameters and cytokine levels at various time points are shown in Table 4. Mean TNF- α concentration was higher at 2 and 4 weeks compared to the first week after implantation ($p = 0.005$; $p = 0.035$). A similar gradual decrease and recovery was observed for IL-1 β and IL-6, with both showing highest levels during the 1st and 12 weeks. IL-10 levels progressively increased over time.

Cytokine Levels and Clinical Parameters

Correlation analyses of smoking habit, atrophy, bone type and insertion torque with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the osseointegration periods can be seen on Figures 1 to 4.

Smoking habit influenced the concentration of all cytokines. After week 2, statistically significant differences were found for IL-1 β and IL-10 ($p=0.013$; $p=0.020$); on week 4 TNF- α , IL-6 and IL-10 were significantly different from baseline analysis ($p=0.05$; $p=0.022$; $p=0.002$). After week 12, IL-1 β and IL-10 showed higher concentrations from baseline ($p=0.043$; $p=0.004$). IL-10 levels were higher in non-smoking patients in all periods, except the first week ($p \leq 0.05$). Gingival inflammation was significantly associated with IL-1 β and IL-6 concentrations on week 4 ($p=0.002$; $p=0.033$) and with TNF- α and IL-6 ($p=0.042$; $p<0.001$) on week 12.

Bone atrophy did not affect IL-10 release significantly. On the first and 2nd weeks, IL-1 β ($p=0.034$; $p=0.023$) and IL-6 ($p=0.011$; $p=0.034$) levels were significantly higher in patients with atrophic jaws. After week 4, TNF- α and IL-6 showed significant increase ($p=0.006$; $p=0.027$). TNF- α levels were significantly high at week 8 for patients with atrophy ($p=0.007$) and at week 12 for non-atrophic patients ($p=0.008$). Only IL-1 β and IL-6 were significantly associated with bone type. On the 2nd week IL-1 β concentrations were higher in type I bone ($p=0.007$), while IL-6 were higher in type II bone at weeks 2 and 4 ($p=0.001$; $p=0.019$). High insertion torque significantly influenced IL-6 release on week 8 ($p=0.002$).

Descriptive Characteristics of Lost Implants

Eleven patients presented clinical complications during the study and osseointegration failed in twelve implants at different times: one after 60 days; six after 90 days and five before 90 days. In general, the clinical parameters were decreasing over the time and only mucositis was present when the dental implant was eventually lost. The concentration variations of interleukins released over time showed that only IL-10 was able to provide a gradual and linear increase predicting implant early loss. A detailed description about the biological behavior of these implants is added in the appendix (Table S1 and Table S2).

DISCUSSION

Our study investigated clinical and biological parameters of soft and bony tissue around dental implants in order to comprehend the inflammatory-driven process during dental implants osseointegration in mandibular edentulous patients. In order to achieve optimal standardization, two implants with same size and diameter were placed in the intraforaminal anterior region of mandible in 30 patients with prolonged edentulism (24.53 ± 13.29 y ears).

Biological parameters related to the healing process have been previously described.^{28, 29} These studies mainly describe differences during the healing process according to the type of implant and/or type of implant loading. Furthermore, most of the biological markers investigated were bone formation markers (transforming growth factor-beta, osteoprotegerin, osteocalcin, osteopontin and parathyroid hormone) and reported only inflammation scores.^{27, 30, 31} Thus, there is a lack of the literature on the investigation of the early healing related to the osseointegration process, especially in edentulous patients and long period of edentulism. In such patients, bone microarchitecture, classified according to the proportion of cortical and trabecular bone determining its quality, can present low or high density which interferes on the blood supply and consequently, on the quality and intensity of cellular responses.³²

A statistically significant decrease in ISQs was seen after 4 weeks compared to baseline measurements. Implant stability around implant sites that presented inflammation reduced significantly after the 1st and 2nd weeks of healing ($p=0.002$; $p=0.05$). Usual ISQ values reported in other studies varied from 60 to 84.^{26, 33-37} The range between 45 and 63 observed in our study can be explained by the direct connection between the smartpeg and the healing abutment, instead of connecting it directly to the implant. Gokmenoglu et al. (2014)³⁴ also found a decrease in ISQ until week 8 when compared to baseline. Güncü et al. (2008)²⁸ only found significant differences in ISQ after 4 weeks of bone healing. Another aspect to be considered is the bone type and the bone quality since our study recruited only edentulous patients that showed prolonged edentulism and decreased bone volume in the anterior region of the mandible. It is therefore not entirely unexpected that this specific population could require more time to reach the acceptable secondary stability, implying a need for longer periods of follow-ups.

Early healing periods during the osseointegration were previously studied^{33, 36, 38, 39}. However, to the best of the authors' knowledge, this is the first study to show the spatial changes in cytokine protein release. Slotte et al.(2012)³⁶ open a new field to be explored in peri-implant osteoimmunology longitudinal studies. As a limitation, the authors indirectly inferred cytokine release according to messenger RNA levels, which can be degraded before translation into protein.

A limited number of clinical studies reported TNF- α concentrations and beyond that the experimental designs are diverse.^{11, 33, 36, 40, 41} TNF- α 's precise release mechanism and function along the osseointegration period remain unclear, mainly because of the high variability of the reported levels.⁴¹ Other studies have shown weak or non-significant release of TNF- α ^{33, 36} and no difference when different types of abutments (rough and smooth) or types of loading (immediate and conventional) were used.^{11, 36} In our study TNF- α levels varied significantly over time with higher concentrations up to the week 4 and a decrease afterwards. Since TNF- α is a potent stimulator of bone resorption and extracellular matrix degradation⁴², the observation of an initial peak with posterior decrease corroborates the current knowledge about osteoimmunology.³⁶ Earlier on, TNF- α was described as an ephemeral cytokine found in the peri-implant microenvironment only in the first 3 days of healing.⁴³

Also, it is worthy to mention that TNF- α showed significantly higher values at week 12 in non-atrophic mandibles and at weeks 4 and 8 in atrophic mandibular ridges. So, the mechanism and intensity of cellular events required for bone remodeling are different.

IL-1 beta was explored as another proxy to bony and connective tissue remodeling inductor. A higher concentration was observed during the first week, especially in response to the bone surgical trauma, an expected finding regardless to antibiotic prescription.^{38, 39} Up to 8 weeks after implantation, no significant changes were seen on IL-1 β levels, denoting this cytokine is not able to discriminate changes in osseointegration during the healing process. Gokmenoglu et al. (2014)³⁴ reported that IL-1 β levels remained unchanged even after light-emitting diode photomodulation (LED) in an attempt to increase osseointegration. Theory exists that IL-1 β might enhance the healing process by protecting the open wound from bacterial colonization and invasion, in the post- surgical site and in inflamed site with plaque accumulation.⁴⁴ The protective role of this cytokine might be illustrated in our trial; since increases in the plaque scores were found at week 8 along with increasing

IL-1 β levels at the same period. Additionally, prolonged production of IL-1 β found in other studies, may also reflect the extent of tissue trauma and delayed wound healing.^{39, 44}

Since one of our goals was to explore different cytokines related with the acute and chronic healing process, IL-6 was included in our panel. Only two studies monitored its production during osseointegration.^{33, 41} IL-6 has been associated with cases involving infection, trauma, and inflammatory states, rising within minutes of an insult and remaining elevated for days. In addition, great tissue trauma has been associated with greater IL-6 production and inflammatory response. Therefore, IL-6 is a reliable marker of injury severity in the acute inflammatory response to surgery and trauma.^{45, 46} Our study presents results that agree with these physiological functions. Increase in IL-6 levels at weeks 1 and 2 are likely connected to acute inflammatory response to implantation. At week 12, high values were again found and were likely related to mucosa trauma caused by prosthesis settlement since peri-implant tissue healing was completed as observed by PD values. IL-6 production was significantly higher for atrophic patients during the first month, and its concentration was also found to be higher in patients with type 2 bone. These findings suggest that higher metabolic bone activity can be observed in edentulous patients with type 2 bone probably due to blood supply.

The role of IL-10 in during the osseointegration as a counterbalance to the proinflammatory process has not been explored in detail. Only two studies quantified this cytokine in the PICF, without conclusive results.^{33, 41} Our study found a progressive increase in IL-10 release along the study, a probable attempt of the host to resolve the inflammation process. It is an important endogenous suppressor of infection and bone resorption by suppressing osteoclastic differentiation.¹⁶ So it can be suggested that IL-10 is an important regulator of bone homeostasis and inflammatory conditions¹⁶, since low IL-10 levels cause insufficient inhibition of pro-inflammatory cytokines and collagenases activity.¹⁷ Corroborating other studies, IL-10 levels were significantly higher in non-smoking patients compared to smokers maybe as a function of modification in macrophages activity^{47, 48}.

Our study presented twelve implants failed at different time points and just one patient presented two lost implants. It is important to note that the clinical parameters showed no critical index, and only mucositis was diagnosed and associated with lost implants, but this was not present in all implants. ISQ values represent the stability

loss of the implants, and variations of IL-10 concentration suggested that it may be capable to indicating early loss of implants, as stated in healthy bone healing implant. After removal of the lost implants, all were replaced by Titamax Cone Morse implants with 3.5 in diameter and 9 mm in length (Neodent Implants Osseointegrated, Curitiba, Brazil), after replacing it waited for the 3 months period to healing and underwent the occlusal loading to installation the mandibular overdenture, it is important to note that the rate success and survival of these implants was 100%. These data are still can not be correlated because they not representative, but allowance for further studies in order to identify bone metabolism for these peri-implant sites.

This is the first study designed to prospectively evaluate osseointegration healing process in totally edentulous patients taking into account bone atrophy, bone type and smoking habits, and some limitations need to be addressed. Further analysis of the mediation potential of different cytokines need to be tested and require larger groups. Also, the stratification of the sample according to smoking habits, nutritional status, gender, among others, would also be interesting. Understanding how different habits and behaviors interact with cytokine release may assist the dental practitioner in choosing the most efficient parameters for a more efficient diagnosis of dental implants success or failure during the follow-ups. Our study evaluated only four types of cytokines, and different inflammatory markers definitely play diverse roles during the healing process, and may synergistically interact with the analyzed cytokines. Further investigation of IL-10 as a marker of bone metabolism and osseointegration consolidation seems promising.

CONCLUSION:

Our data provides a new insight for the course of healing monitoring and cytokine release along the first three months following implant placement. The clinical parameters indicated that the critical period to PI and GI were weeks 1 and 2. The PD stabilized just at 8th week and ISQ values decreased after four weeks of healing. The variations in the cytokine concentrations and their predominant role can be attributed to healing balance in different periods of time, and the cytokines may interact synergistically with each other, being influenced by the clinical parameters and population characteristics. We can assume that the bone type, the smoking habits, and the presence or absence of atrophy may change and affect the cytokine

levels releasing during the implant osseointegration. Our study showed that not all evaluated cytokines have the potential to be markers for peri-implant monitoring health. It is still difficult to establish which cytokine levels are considered within normal ranges, and larger datasets in order to explore stratified data and predict disease outcomes are recommended for future studies.

Acknowledgment

The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Papaspyridakos P, Chen CJ, Singh M, Weber HP, Gallucci GO. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. *J Dental Research* 2012;91:242-248.
2. Duarte PM, de Mendonca AC, Maximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol* 2009;80:234-243.
3. Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin Implant Dent Rel Res* 2016;18:192-203.
4. Shanbhag S, Shanbhag V, Stavropoulos A. Genomic analyses of early peri-implant bone healing in humans: a systematic review. *Int J Implant Dent* 2015;1:5.
5. Javed F, Al-Hezaimi K, Salameh Z, Almas K, Romanos GE. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine* 2011;53:8-12.
6. Mossmann T, Sad S. The Expanding Universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more. *Rev Immun Today* 1996;17:138-146.
7. Hall J, Pehrson N-G, Ekestubbe A, Jemt T, Friberg B. A controlled, cross-sectional exploratory study on markers for the plasminogen system and inflammation in crevicular fluid samples from healthy, mucositis and peri-implantitis sites. *Eur J Oral Implantol* 2015;8:153-166.
8. Mundy GR. Cytokines and Bone Remodeling. *J Bone Metab* 1991;9.
9. Ataoglu H, Alptekin NO, Haliloglu S, et al. Interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid: Correlation with clinical parameters and effect of smoking. *Clinl Oral Implants Res* 2002;13:470-476.
10. Li JY, Wang HL. Biomarkers associated with periimplant diseases. *Implant Dent* 2014;23:607-611.
11. Boynuegri AD, Yalim M, Nemli SK, Erguder BI, Gokalp P. Effect of different localizations of microgap on clinical parameters and inflammatory cytokines in

- peri-implant crevicular fluid: a prospective comparative study. *Clin Oral Invest* 2012;16:353-361.
12. Stow JL, Murray RZ. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytok Growth Fac Rev* 2013;24:227-239.
 13. Stow JL, Low PC, Offenhauser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology* 2009;214:601-612.
 14. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22:347-352.
 15. Shrum JP. Cytokines. *ClinDermatol* 1996;14:331-336.
 16. Zhang Q, Chen B, Yan F, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int* 2014;2014:284836.
 17. Guncu GN, Akman AC, Gunday S, Yamalik N, Berker E. Effect of inflammation on cytokine levels and bone remodelling markers in peri-implant sulcus fluid: a preliminary report. *Cytokine* 2012;59:313-316.
 18. Cavallaro J, Greenstein B, Greenstein G. Clinical Methodologies for Achieving Primary Dental Implant Stability. *J Am Dent Assoc* 2009;140:1366-1372.
 19. Javed F, Ahmed HB, Crespi R, Romanos GE. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interv Med Appl Sci* 2013;5:162-167.
 20. Oates TW, Valderrama P, Bischof M, et al. Enhanced Implant Stability with a Chemically Modified SLA Surface A Randomized Pilot Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22:755- 760.
 21. Xie Q-F, Ainamo A. Correlation of gonial angle size with cortical thickness, height of the mandibular residual body, and duration of edentulism. *J Prosthet Dent* 2004;91:477-482.
 22. Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1988;17:232-236.
 23. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:145-151.
 24. Al-Nawas B, Bragger U, Meijer HJ, et al. A double-blind randomized controlled trial (RCT) of Titanium-13Zirconium versus Titanium Grade IV small-diameter

- bone level implants in edentulous mandibles--results from a 1-year observation period. *Clin Implant Dent Rel Res* 2012;14:896-904.
25. Onuma T, Aquiar K, Duarte PM, et al. Levels of Osteodastogenesis-Related Factors in the Peri-Implant Crevicular Fluid and Clinical Parameters of Immediately loaded Implants in Patients with Osteopenia: A Short-Term Report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015;30:1431-1436.
 26. Dogan SB, Kurtis MB, Tuter G, Serdar M, Watanabe K, Karakis S. Evaluation of Clinical Parameters and Levels of Proinflammatory Cytokines in the Crevicular Fluid Around Dental Implants in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Oral Maxillofac Implants The International journal of oral & maxillofacial implants* 2015;30:1119-1127.
 27. Tsoukaki M, Kalpidis CD, Sakellari D, Tsalikis L, Mikrogiorgis G, Konstantinidis A. Clinical, radiographic, microbiological, and immunological outcomes of flapped vs. flapless dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clinl Oral Implants Res* 2013;24:969-976.
 28. Güncü GN, Tözüm TF, Güncü MB, Yamalik N. Relationships between implant stability, image-based measures and nitric oxide levels. *Journal of oral rehabilitation* 2008;35:745-753.
 29. Taxel P, Ortiz D, Shafer D, et al. The relationship between implant stability and bone health markers in post-menopausal women with bisphosphonate exposure. *Clin Oral Invest* 2014;18:49-57.
 30. Prati AJ, Casati MZ, Ribeiro FV, et al. Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: A randomized clinical trial. *J Dental Research* 2013;92:161S-167S.
 31. Basegmez C, Yalcin S, Yalcin F, Ersanli S, Mijiritsky E. Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: a prospective study. *Implant Dent* 2012;21:306-310.
 32. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biologic Chemist* 2010;285:25103-25108.
 33. Emecen-Huja P, Eubank TD, Shapiro V, et al. Peri-implant versus periodontal wound healing. *J Clin Periodontol* 2013;40:816-824.

34. Gokmenoglu C, Ozmeric N, Erguder I, Elgun S. The effect of light-emitting diode photobiomodulation on implant stability and biochemical markers in peri-implant crevicular fluid. *Photomed Laser Surg* 2014;32:138-145.
35. Güncü MB, Aslan Y, Tümer C, Güncü GN, Uysal S. In-patient comparison of immediate and conventional loaded implants in mandibular molar sites within 12 months. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:335-341.
36. Slotte C, Lenneras M, Gothberg C, et al. Gene expression of inflammation and bone healing in peri-implant crevicular fluid after placement and loading of dental implants. A kinetic clinical pilot study using quantitative real-time PCR. *Clin Implant Dent Rel Res* 2012;14:723-736.
37. Tozum TF, Turkyilmaz I, Yamalik N, et al. Analysis of the possible impact of inflammation severity and early and delayed loading on nitric oxide metabolism around dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:547-556.
38. Gruber R, Nadir J, Haas R. Neutrophil elastase activity and concentrations of interleukin 1-beta in crevicular fluid after immediate replacement and immediate loading of implants. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010;48:228-231.
39. Khoury SB, Thomas L, Walters JD, Sheridan JF, Leblebicioglu B. Early wound healing following one-stage dental implant placement with and without antibiotic prophylaxis: a pilot study. *J Periodontol* 2008;79:1904-1912.
40. Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. *Clin Implant Dent Rel Res* 2008;10:166-173.
41. Nogueira-Filho G, Pesun I, Isaak-Ploegman C, Wijegunasinghe M, Wierzbicki T, McCulloch CA. Longitudinal comparison of cytokines in peri-implant fluid and gingival crevicular fluid in healthy mouths. *J Periodontol* 2014;85:1582-1588.
42. Gurol C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:955-960.
43. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392-1404.

44. Graves DT, Nooh N, Gillen T, et al. IL-1 Plays a Critical Role in Oral, But Not Dermal, Wound Healing. *J Immunol* 2001;167:5316-5320.
45. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science. *J Intensive Care Med* 2011;26:3-12.
46. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *J Intensive Care Med* 2011;26:73-87.
47. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J* 1999;4:309–314.
48. Rioux N, Castonguay A. 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone modulation of cytokine release in U937 human macrophages. *Cancer Immunol, Immunother: CII* 2001;49:663-670.

Figure 1. Comparative analyses of smoking habit with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.

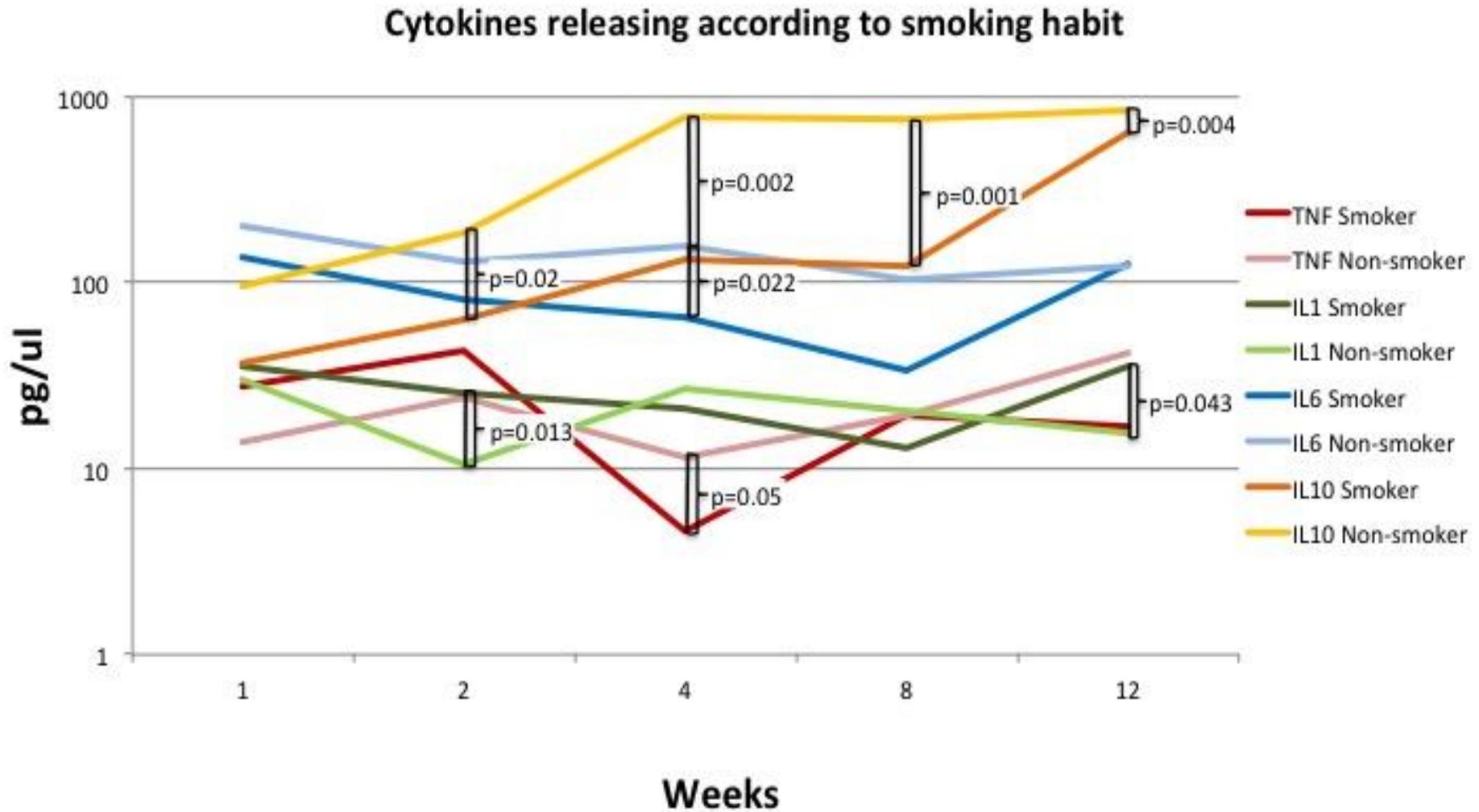


Figure 2. Comparative analyses of bone atrophy with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.

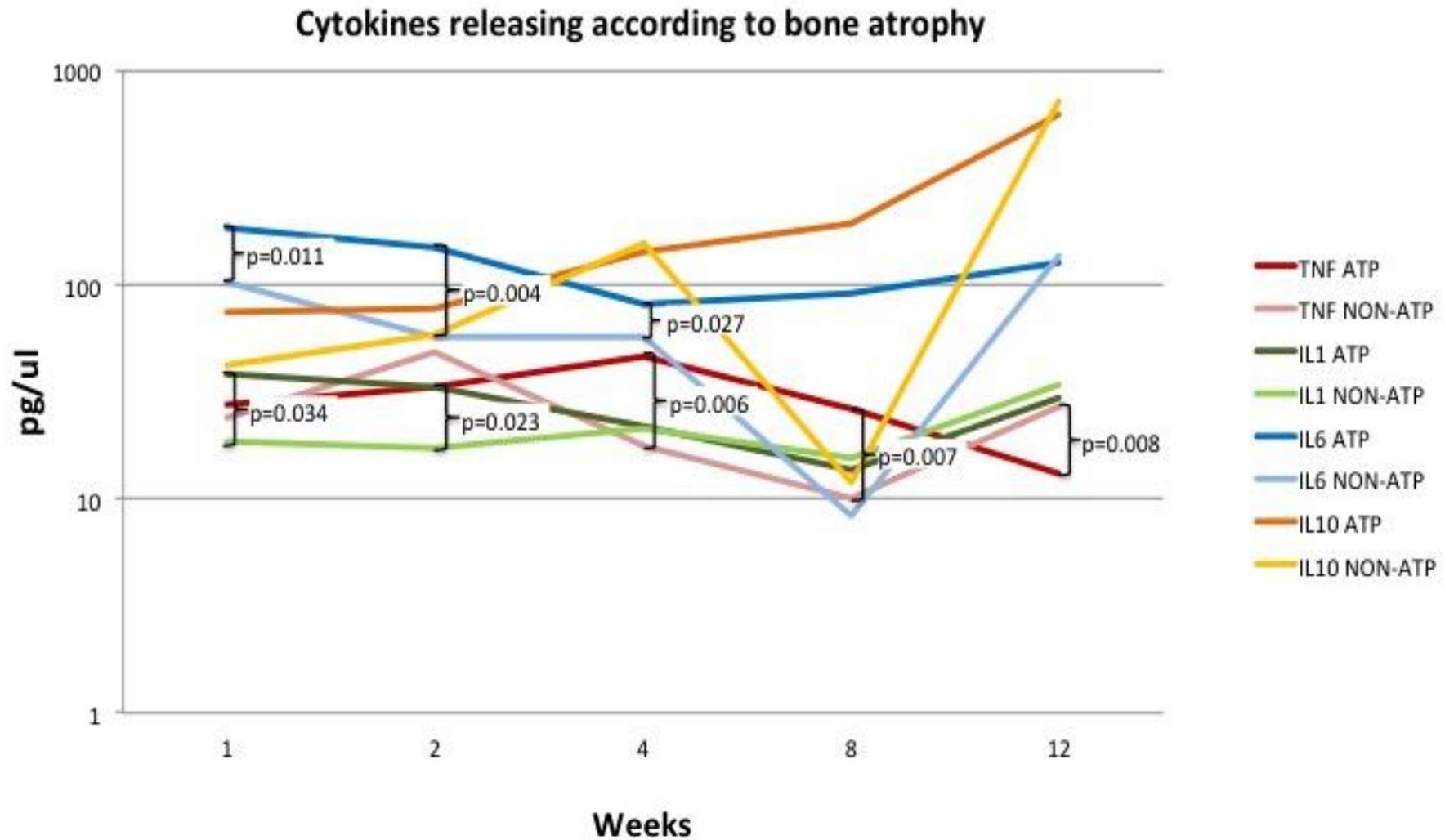


Figure 3. Comparative analyses of bone type with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.

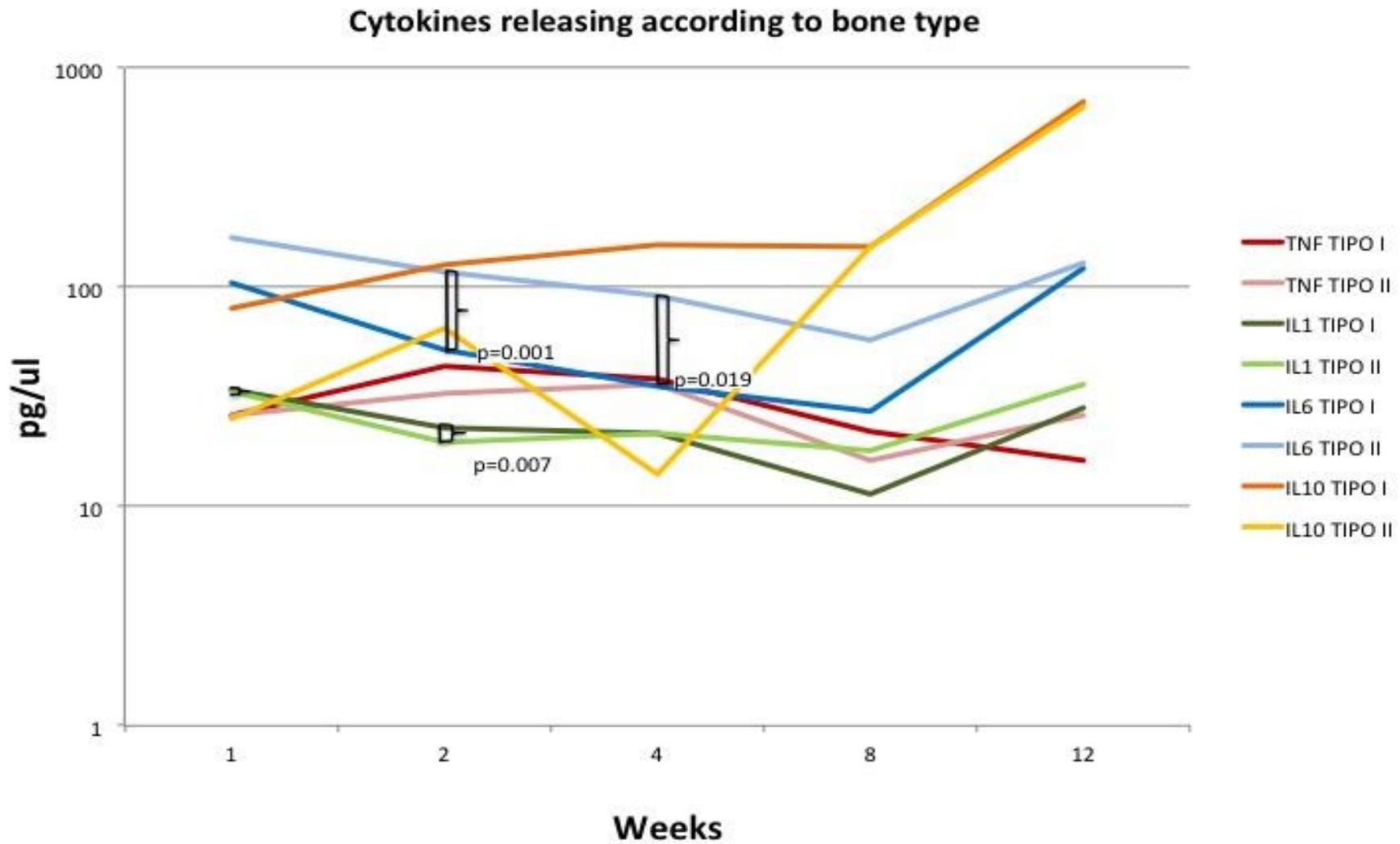


Figure 4. Comparative analyses of insertion torque with levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in the peri-implant fluid (pg/ μ l) during the evaluation periods.

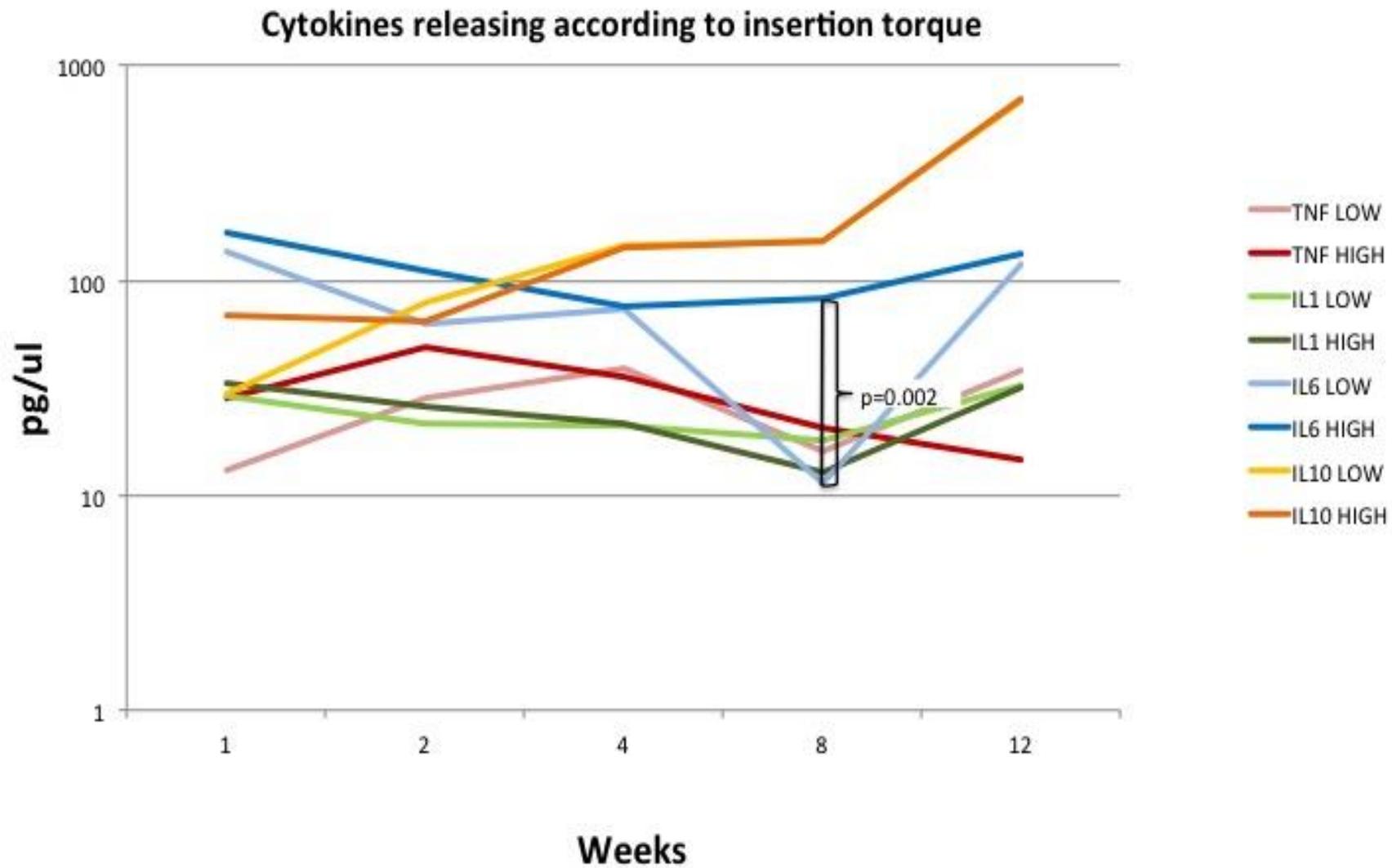


Table1. Patient Characteristics according to their gender (N=30).

	Female (n=20)	Male (n=10)
Age(years)	67.1(8.31)	67.5(6.36)
Edentulism Time (years)	28.1(12.63)	17.4(11.86)
Bone height in the anterior region (mm)	22.78(3.9)	24.7(3.26)
Superior height of the foramina (mm)	4.3(3.51)	3.48(3.29)
Distance between foramen (mm)	58.72(10.0)	59.97(13.74)
Mandibular Body Length (mm)	111.83(8.07)	111.69(8.21)
Bone Type (Type 1 / Type 2)*	12/28	8/12
Insertion Torque (<32N/ >32N)*	21/19	6/14
Bone Atrophy (Yes/No) [†]	7/13	6/4
Smoke (Yes/No) [†]	3/17	2/8

*Bone Type and insertion torque values refer to number of implants

[†]Bone Atrophy and Smoke habit values refer to number of patients

Table 2. Comparison of Means and Standard Deviations of Clinical Parameters, and ISQ values Measured at Baseline, as a function of Follow up Time for healthy implants (N=48).

Week	0(baseline)	1	2	4	8	12
PI		0.58(0.49)	0.58(0.49)	0.66(0.48)	0.44(0.50)	0.52(0.50)
Calculus		0	0	0.12(0.30)	0.27(0.44)	0.08(0.27)
GI		0.64(0.48)	0.35(0.48)	0.12(0.33)	0.10(0.31)	0.06(0.06)
PD		-	3.85(0.96)	3.20(1.10)	2.81(0.84)	2.74(0.79)
BOP		-	0.04(0.20)	0.02(0.14)	0.08(0.28)	0.04(0.20)
ISQ	55.73(3.97)	56.12(4.08)	55.80(6.20)	52.22(7.94)	51.78(6.29)	52.15(7.10)

PI, Calculus, GI and BOP were indexed, and were dichotomized for analysis with ANOVA.

Table 3. Means and Standard Deviations of cytokine Concentrations in the PICF (pg/μl) at 1, 2, 4, 8 and 12 weeks after implantation of the healthy implants (N=48)

Week	Follow-up Time (week)				
	1	2	4	8	12
	Mean/ SD Sample/N sample				
TNF-α	28.58(23.64) 46/48	41.33(26.05) 45/48	40.01(31.24) 44/48	23.80(25.4) 42/47	26.84(25.73) 36/48
IL-1β	102.31(162.38) 45/48	68.08(130.08) 48/48	24.76(21.95) 48/48	19.11(20.64) 39/47	73.81(142.12) 48/48
IL-6	183.32(182.19) 46/48	128.29(129.87) 45/48	94.90(85.38) 46/48	86.65(128.44) 37/47	177.78(184.41) 47/48
IL-10	88.05(123.82) 37/48	191.60(270.0) 43/48	298.99(304.10) 46/48	326.81(319.88) 46/47	583.69(282.88) 48/48

Values are mean±SD. TNF- α , IL-1β , IL-6 and IL-10 are expressed in pg/μl per sample. Frequencies of cytokines detection in PICF sample are shown under the levels values.

Table 4. Comparative statistics (P-values) of dental implants with respect to the reference time points.

	ISQ	PI	GI	PD	BOP	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10
Baseline vs 1 week	0.462	-	-	-	-	-	-	-	-
Baseline vs 2 week	0.947	-	-	-	-	-	-	-	-
Baseline vs 4 week	0.005	-	-	-	-	-	-	-	-
Baseline vs 8 week	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-
Baseline vs 12 week	<0.001	-	-	-	-	-	-	-	-
1 vs. 2 week	0.626	0.998	0.01	-	-	0.005	0.279	0.01	0.003
1 vs. 4 week	0.007	0.345	<0.001	-	-	0.035	0.030	0.002	<0.001
1 vs. 8 week	<0.001	0.126	<0.001	-	-	0.153	0.001	0.003	<0.001
1 vs. 12 week	<0.001	0.491	<0.001	-	-	0.7	0.604	0.825	<0.001
2 vs. 4 week	0.001	0.394	0.002	<0.001	0.317	0.739	0.103	0.042	0.005
2 vs. 8 week	0.001	0.144	<0.001	<0.001	0.157	0.003	0.009	0.013	0.012
2 vs. 12 week	0.002	0.577	0.002	<0.001	0.158	0.006	0.166	0.119	<0.001
4 vs. 8 week	0.551	0.011	0.014	0.001	0.322	0.008	0.094	0.109	0.465
4 vs. 12 week	0.946	0.012	0.08	0.006	0.333	0.042	0.005	0.040	<0.001
8 vs. 12 week	0.467	0.414	0.08	0.418	0.997	0.357	0.003	0.005	<0.001

(-)= There is not statistic available

(Bold Number)= Significant P<0.05

The analyses only can be doing on the lines.

Supplementary Material

Table S1. Comparison of Means and Standard Deviations of the Clinical Parameters and the Mucositis Diagnosis as a function of Follow up Time for the lost implants.

Week	1 (N=12)	2 (N=12)	4 (N=12)	8 (N=11)	12 (N=6)
PI	2.08(0.9)	1.75(0.62)	1.75(0.86)	1.5(1)	1.5(0.83)
Calculus	0	0	0	0.16(0.38)	0
GI	2.08(0.79)	1.33(0.77)	0.33(0.49)	0.25(0.45)	0
PD	-	3.77(0.96)	3.4(0.86)	3.04(1.1)	2.47(0.57)
BOP	-	0.1(0.29)	0	0.1(0.29)	0
Mucositis	0	7	7	5	2

Table S2. Means and Standard Deviations of cytokine Concentrations in the PICF (pg/μl), and ISQ Measured at Baseline, and 1, 2, 4, 8 and 9 weeks post-surgery on lost implants.

	Follow-up Time (week)					
	Mean/ SD					
	Sample/N sample					
0(Baseline)	1	2	4	8	12	
TNF-α	46.68(32.8)	34.62(28.1)	65.15(43.54)	34.95(21.06)	41.97(40.88)	
	11/12	11/12	6/12	11/11	6/6	
IL-1β	138.79(200.72)	17.98(11.49)	18.78(9.48)	23.85(32.56)	35.52(27.65)	
	11/12	11/12	11/12	10/11	6/6	
IL-6	160.58(82.69)	98.18(119.28)	62.48(54.97)	67.95(77.67)	154.93(86.15)	
	11/12	9/12	12/12	8/11	5/6	
IL-10	76.06(153.27)	320.35(323.41)	473.88(334.41)	524.55(327.4)	602.84(353.93)	
	6/12	11/12	10/12	1/11	6/6	
ISQ	51.97(8.49)	51.75(11.46)	45.18(18.05)	37.52(14.08)	27.25(21.25)	32.16(16.92)
	[12 implants]	[12 implants]	[12 implants]	[12 implants]	[11 implants]	[6 implants]

Values are mean±SD. TNF- α , IL-1β , IL-6 and IL-10 are expressed in pg/μl per sample. Frequencies of cytokines detection in PICF sample are shown under the levels values. ISQ present the mean±SD following the period and the number of implants analyses.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo clínico em que se avaliou o período de cicatrização precoce em pacientes desdentados totais levando em consideração o hábito de fumar e indicadores clínicos como atrofia óssea, tipo de osso e torque de inserção alcançado no leito cirúrgico. Embora os resultados deste estudo indiquem diferenças entre os parâmetros clínicos avaliados, estes não foram indicativos de perda de osseointegração e nem de instalação de doença peri-implantar.

A avaliação da estabilidade dos implantes por meio de ISQ, demonstrou que os valores obtidos na estabilidade primária não foram mantidos durante o período de osseointegração. Porém mesmo com uma diminuição significativa nas médias de estabilidade secundária, os implantes considerados saudáveis se mantiveram estáveis e ao fim do período de acompanhamento apresentaram-se clinicamente osseointegrados.

A quantificação dos diferentes marcadores inflamatórios indicou que estes podem desempenhar papéis diversificados durante o processo de cicatrização, e podem sinergicamente interagir entre si, podendo ser influenciados por parâmetros clínicos e pelas características da população. A IL-10 se apresentou como um promissor marcador do metabolismo ósseo, especialmente em populações de idosos desdentados totais ou populações que possam apresentar níveis subclínicos de osteopenia. Porém mais estudos de acompanhamento desse período de osseointegração são necessários afim de, se obter maiores evidências quanto a expressão dos marcadores inflamatórios.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, I. et al. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 4, p. 381-92, Aug 2004.

AKSOY, U.; ERATALAY, K.; TOZUM, T. F. The possible association among bone density values, resonance frequency measurements, tactile sense, and histomorphometric evaluations of dental implant osteotomy sites: a preliminary study. **Implant Dent**, v. 18, n. 4, p. 316-25, Aug 2009.

AL-NAWAS, B. et al. A double-blind randomized controlled trial (RCT) of Titanium-13Zirconium versus Titanium Grade IV small-diameter bone level implants in edentulous mandibles--results from a 1-year observation period. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, n. 6, p. 896-904, Dec 2012.

ALBREKTSSON, T.; ZARB, G. Determinations os correct clinical reporting. **The International Journal of Prhodontics**, v. 11, n. 5, p. 517-521, 1998.

ALSABEEHA, N. H. et al. Primary stability measurements of single implants in the midline of the edentulous mandible for overdentures. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 5, p. 563-6, May 2010.

BASEGMEZ, C. et al. Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: a prospective study. **Implant Dent**, v. 21, n. 4, p. 306-10, Aug 2012.

BASSI, F. et al. Clinical outcomes measures for assessment of longevity in the dental implant literature: ORONet approach. **Int J Prosthodont**, v. 26, n. 4, p. 323-30, Jul-Aug 2013.

BERGENDAL, T.; ENGQUIST, B. Implant-supported overdentures: a longitudinal prospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 13, n. 2, p. 253-62, Mar-Apr 1998.

BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, n. 6053, p. 516-8, Feb 6-12 1986.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOYNUEGRI, A. D. et al. Effect of different localizations of microgap on clinical parameters and inflammatory cytokines in peri-implant crevicular fluid: a prospective comparative study. **Clin Oral Investig**, v. 16, n. 2, p. 353-61, Apr 2012.

CAVALLARO, J.; GREENSTEIN, B.; GREENSTEIN, G. Clinical Methodologies for Achieving Primary Dental Implant Stability. **The Journal of the American Dental Association**, v. 140, n. 11, p. 1366-1372, 2009.

CHANG, P. C.; LANG, N. P.; GIANNOBILE, W. V. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 1, p. st1-12, Jan 2010.

CHRCANOVIC, B. R.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Reasons for failures of oral implants. **J Oral Rehabil**, v. 41, n. 6, p. 443-76, Jun 2014.

CLEMENTINI, M. et al. Systemic risk factors for peri-implant bone loss: a systematic review and meta-analysis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 3, p. 323-34, Mar 2014.

DA SILVA, R. J. et al. Resonance frequency analysis of overdenture retainer implants with immediate loading. **Gerodontology**, v. 29, n. 2, p. e408-12, Jun 2012.

DERKS, J. et al. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: early and late implant loss. **J Dent Res**, v. 94, n. 3 Suppl, p. 44S-51S, Mar 2015.

DOS SANTOS, M. V.; ELIAS, C. N.; CAVALCANTI LIMA, J. H. The effects of superficial roughness and design on the primary stability of dental implants. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 13, n. 3, p. 215-23, Sep 2011.

DUARTE, P. M. et al. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. **J Periodontol**, v. 80, n. 2, p. 234-43, Feb 2009.

ELSYAD, M. A.; ELSAIH, E. A.; KHAIRALLAH, A. S. Marginal bone resorption around immediate and delayed loaded implants supporting a locator-retained mandibular overdenture. A 1-year randomised controlled trial. **J Oral Rehabil**, v. 41, n. 8, p. 608-18, Aug 2014.

ELSYAD, M. A.; SHOUKOUKI, A. H. Resilient liner vs. clip attachment effect on peri-implant tissues of bar-implant-retained mandibular overdenture: a 1-year clinical and radiographical study. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, n. 5, p. 473-80, May 2010.

FONSECA, F. J. et al. Cytokines expression in saliva and peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant disease. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 2, p. e68-72, Feb 2014.

FREDERIKSEN, N. L. Diagnostic imaging in dental implantology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 80, n. 5, p. 540-54, Nov 1995.

FRIBERG, B. et al. One-year results of a prospective multicenter study on Branemark System implants with a TiUnite surface. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 7 Suppl 1, p. S70-5, 2005.

GRONDAHL, H. G. et al. An image plate system for digital intra-oral radiography. **Dent Update**, v. 23, n. 8, p. 334-7, Oct 1996.

GRUTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 1, p. 3-15, Jan 2005.

GULJE, F. et al. Mandibular overdentures supported by 6-mm dental implants: a 1-year prospective cohort study. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14 Suppl 1, p. e59-66, May 2012.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, II. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1092, p. 385-96, Dec 2006.

HU, K. F. et al. Interleukin-10 (-592 C/A) and interleukin-12B (+16974 A/C) gene polymorphisms and the interleukin-10 ATA haplotype are associated with periodontitis in a Taiwanese population. **J Periodontal Res**, v. 44, n. 3, p. 378-85, Jun 2009.

JAVED, F. et al. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. **Interv Med Appl Sci**, v. 5, n. 4, p. 162-7, Dec 2013.

JAVED, F. et al. Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Cytokine**, v. 53, n. 1, p. 8-12, Jan 2011.

JAVED, F.; ROMANOS, G. E. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. **J Dent**, v. 38, n. 8, p. 612-20, Aug 2010.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **Int Immunol**, v. 22, n. 5, p. 347-52, May 2010.

KNAUPER, V. et al. Biochemical characterization of human collagenase-3. **J Biol Chem**, v. 271, n. 3, p. 1544-50, Jan 19 1996.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, n. 5089, p. 1798-801, Dec 11 1992.

LACHMANN, S. et al. Reliability of findings around healthy implants in association with oral hygiene measures: a clinical, microbiological, and immunological follow-up in edentulous patients. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 6, p. 686-98, Dec 2007.

LACHMANN, S. et al. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B +3954 genotype. A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 2, p. 212-23, Apr 2007.

LACHMANN, S. et al. A comparison of implant-supported, bar- or ball-retained mandibular overdentures a retrospective clinical, microbiologic, and immunologic study of 10 edentulous.pdf>. 2007.

LANG, N. P.; BERGLUNDH, T.; WORKING GROUP 4 OF SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, P. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 38 Suppl 11, p. 178-81, Mar 2011.

LINDHE, J.; MEYLE, J.; GROUP, D. O. E. W. O. P. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 8 Suppl, p. 282-5, Sep 2008.

LISTGARTEN, M. A. et al. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants [corrected and republished with original paging, article originally printed in Clin Oral Implants Res 1991 Jan-Mar;2(1):1-19]. **Clin Oral Implants Res**, v. 2, n. 3, p. 1-19, Jul-Sep 1991.

MACDONALD, B. R.; GOWEN, M. The Cell Biology of Bone.pdf>. **Baillière's Clinical Rheumatology**, v. 7, n. 3, p. 421-443, 1993.

MISHLER, O. P.; SHIAU, H. J. Management of peri-implant disease: a current appraisal. **J Evid Based Dent Pract**, v. 14 Suppl, p. 53-9, Jun 2014.

MOILANEN, M. et al. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol**, v. 197, n. 1, p. 72-81, May 2002.

MOMBELLI, A. et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiol Immunol**, v. 2, n. 4, p. 145-51, Dec 1987.

MUNDY, G. R. Cytokines and Bone Remodeling. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 9, n. 2, 1991.

NATALI, A. N.; CARNIEL, E. L.; PAVAN, P. G. Investigation of viscoelastoplastic response of bone tissue in oral implants press fit process. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 91, n. 2, p. 868-75, Nov 2009.

OATES, T. W. et al. Enhanced Implant Stability with a Chemically Modified SLA Surface A Randomized Pilot Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 22, p. 755- 60, 2007.

PANAGAKOS, F. S. et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, n. 6, p. 794-9, Nov-Dec 1996.

PAPASPYRIDAKOS, P. et al. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. **J Dent Res**, v. 91, n. 3, p. 242-8, Mar 2012.

PREOTEASA, E.; IMRE, M.; PREOTEASA, C. T. A 3-year follow-up study of overdentures retained by mini-dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 29, n. 5, p. 1170-6, Sep-Oct 2014.

QUESADA-GARCIA, M. P. et al. Measurement of dental implant stability by resonance frequency analysis: a review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 10, p. e538-46, Oct 2009.

QUIRYNEN, M. et al. Small-diameter titanium Grade IV and titanium-zirconium implants in edentulous mandibles: three-year results from a double-blind, randomized controlled trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 7, p. 831-40, Jul 2015.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J Biol Chem**, v. 285, n. 33, p. 25103-8, Aug 13 2010.

ROMANOS, G. E. et al. Bone-implant interface around titanium implants under different loading conditions: a histomorphometrical analysis in the *Macaca fascicularis* monkey. **J Periodontol**, v. 74, n. 10, p. 1483-90, Oct 2003.

SAGAWA, K. et al. Suppression by IL-10 and IL-4 of cytokine production induced by two-way autologous mixed lymphocyte reaction. **Cytokine**, v. 8, n. 6, p. 501-6, Jun 1996.

SALVI, G. E.; LANG, N. P. Diagnostic Parameters for Monitoring. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 19, p. 117-27, 2004.

SATO, H. et al. Association between radiographic findings in the mandibular condyle and temporomandibular dysfunction in an elderly population. **Acta Odontol Scand**, v. 54, n. 6, p. 384-90, Dec 1996.

SCEPANOVIC, M. et al. Immediately loaded mini dental implants as overdenture retainers: 1-Year cohort study of implant stability and peri-implant marginal bone level. **Ann Anat**, v. 199, p. 85-91, May 2015.

SCHIERANO, G. et al. Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 9, p. 1675-1682, Sep 2000.

SCHRAUFSTATTER, I. U. et al. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum. **Immunology**, v. 135, n. 4, p. 287-98, Apr 2012.

SCHROEDER, A. et al. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. **J Maxillofac Surg**, v. 9, n. 1, p. 15-25, Feb 1981.

TATAKIS, D. N.; SCHNEEBERGER, G.; DZIAK, R. Recombinant IL-1 stimulates PGE₂ production in osteoblastic cells. **Calcified Tissue International**, v. 42, n. 6, p. 358-62, 1988.

TERHEYDEN, H. et al. Osseointegration--communication of cells. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 10, p. 1127-35, Oct 2012.

THALJI, G. N.; NARES, S.; COOPER, L. F. Early molecular assessment of osseointegration in humans. **Clin Oral Implants Res**, v. 25, n. 11, p. 1273-85, Nov 2014.

TRINDADE, R. et al. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. **Clin Implant Dent Relat Res**, Sep 25 2014.

YAMAMOTO, K. et al. Inhibitory effect of bone resorption and inflammation with etidronate therapy in patients with rheumatoid arthritis for 3 years and in vitro assay in arthritis models. **Rheumatol Int**, v. 26, n. 7, p. 627-32, May 2006.

ZANCOPE, K. et al. Immediate loading implants with mandibular overdenture: a 48-month prospective follow-up study. **Brazilian Oral Research**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

ZARB, G. A. Clinical application of osseointegration. An introduction. **Swed Dent J Suppl**, v. 28, p. 7-9, 1985.

APÉNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: Métodos de monitoramento de saúde peri-implantar durante o processo de ósseointegração

Pesquisadores Responsáveis: Mestranda Amália Machado Bielemann
Professora Dra. Fernanda Faot

Justificativa: O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa porque foi verificado que o(a) senhor(a) irá realizar cirurgia para colocação de implantes dentários.

Objetivo: Esta pesquisa está sendo realizada para monitorar o processo de cicatrização do tecido peri implantar e a osseointegração de mini-implantes para ancorar overdentures com a finalidade de aumentar a retenção e estabilidade de sua prótese total mandibular.

Procedimentos: Para alcançarmos nossos objetivos precisamos de sua participação, e que faça o comparecimento as consultas previamente agendadas em que serão feitos testes para mensurar a saúde de seu implante durante a fase de cicatrização através de um equipamento que fornece informações do quanto existe de contato entre o osso e o implante. Além disso, a saúde dos tecidos peri-implantares (ao redor do implante) será avaliada neste período através da coleta do fluido peri-implantar na região do implantes. Este procedimento será feito através da inserção de uma fita de papel absorvente ao lado do implante.

Esses testes serão avaliados em cinco diferentes tempos: “baseline” (T0 – no dia da instalação) e 7, 15, 30, 90 e 180 dias após a instalação dos implantes.

Benefícios e vantagens ao voluntário: O(A) senhor(a) terá o benefício de receber o diagnóstico e tratamento odontológico geral necessário, e também a colocação dos implantes. O tratamento odontológico geral, bem como o seu tratamento protético serão realizados pelos pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Fernanda Faot e pela Mestranda Amália Machado Bielemann

Métodos alternativos e benéficos: As avaliações a serem realizadas representam o método menos invasivo de avaliação.

Desconfortos e riscos previsíveis: Os testes a serem realizados não geram desconfortos ou riscos para o paciente pois não são invasivos.

Forma de acompanhamento e garantia de esclarecimento: O(A) senhor(a) será acompanhado durante toda a pesquisa e qualquer problema observado deverá ser relatado. O(A) senhor(a) tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida relacionada à pesquisa. Os pesquisadores responsáveis assumem o compromisso de proporcionar toda a informação necessária e acompanharão e assistirão todos os voluntários em qualquer momento durante a pesquisa. Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida, o(a) senhor(a) deverá entrar em contato com a Profa. Fernanda, pessoalmente ou por telefone (053) 81001166, ou com a Mestranda Amália (053) 81093954.

Garantia de sigilo: Os pesquisadores responsáveis se comprometem a resguardar todas as informações da pesquisa. Nunca será revelada a identidade do(a) senhor(a). Os dados desta pesquisa serão utilizados para fins estritamente científicos.

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa: A decisão de fazer parte ou não desta pesquisa é voluntária. O(A) senhor(a) pode escolher se quer ou não participar dela, e da mesma maneira, o(a) senhor(a) é livre para desistir dela em qualquer momento.

Caso o senhor(a) não possa participar ou se retire da pesquisa por qualquer motivo, o senhor(a) não sofrerá nenhum tipo de prejuízo, assim como sua decisão não afetará seu tratamento odontológico na Faculdade de Odontologia – UFPel.

Caso o(a) senhor(a) aceite livremente participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) receberá uma segunda via assinada do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando a primeira via com a Profa. Responsável pela pesquisa, sendo que as duas vias poderão ser anuladas em qualquer momento do desenvolvimento da pesquisa, segundo sua livre decisão.

.Eu, _____
 certifico que tendo lido e entendido todas as informações acima descritas, estou de acordo com a realização do estudo e aceito participar voluntariamente do mesmo.

Pelotas, _____ de _____ de 2014.

 Nome do voluntário / RG

 Assinatura do voluntário

Amália Machado Bieleman

Nome do pesquisador
 pesquisador

 Assinatura do

Qualquer dúvida sobre este pesquisa, por favor comunicar-nos, a fim de responder a suas perguntas:

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Pelotas: Rua Gonçalves Chaves, 470 CEP 96015-560, Pelotas – RS. Fone/Fax (53)32256741/ (53) 32224162

Apêndice B – Nota da Dissertação

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais.

A presente dissertação de mestrado teve por objetivo investigar o processo de cicatrização e osseointegração de implantes dentais inseridos na região anterior de mandíbula em pacientes desdentados totais. Para tanto, estes pacientes foram monitorados clinicamente durante um período de três meses, para avaliação da cicatrização dos tecidos peri-implantares, estabilidade do implante e das concentrações de biomarcadores inflamatórios presentes no fluido crevicular peri-implantar. Estas análises são importantes, pois podem aprimorar a compreensão dos eventos fisiológicos a nível tecidual para a determinação do sucesso ou falha dos implantes dentários. Apesar dos resultados encontrados para as medidas clínicas de saúde do tecido peri-implantar apresentarem diferenças entre os períodos de avaliação, estas não foram indicativas de falha precoce do implante ou da instalação de doenças peri-implantares. As variações de concentrações das citocinas e o aumento de suas expressões em determinados períodos de avaliação podem ser atribuídas as diferentes fase da cicatrização e do equilíbrio do processo de reparo ósseo. Esta pesquisa foi pioneira na tentativa de explicar a osseointegração por meio do estudo de marcadores inflamatórios mapeados desde o cicatrização precoce, explorando as eventuais relações dos mesmos com fatores relacionados a disponibilidade e qualidade do tecido ósseo, fumo e indicadores da saúde peri-implantar. Entretanto novos marcadores biológicos necessitam ser estudados durante este período para que a sequência de eventos no tecido peri-implantar, uma vez conhecida em profundidade por meio de estudos clínicos, possa se tornar preditiva de diagnósticos precoces do desequilíbrio biológico.

Campo de pesquisa: Clínica Odontológica, Prótese Dentária

Candidato: Amália Machado Bielemann, Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (2014)

Data de defesa/Horário: 26/02/2016 a realizar-se às 14 horas

Local: Sala 710, localizada no 7º andar da Faculdade de Odontologia Universidade Federal de Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457.

Membros da Banca:

Profª. Drª. Luciana de Rezende Pinto – Universidade Federal de Pelotas – Doutora em Odontologia, Área de Reabilitação Oral, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Brasil.

Profª. Drª. Natália Marcumini Pola – Universidade federal de Pelotas - Doutora em Odontologia, Área de concentração Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Brasil.

Dr. José Antônio Mesquita Damé (Suplente) - Universidade federal de Pelotas - Doutor em Odontologia, Área de Concentração Periodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, Brasil.

Orientadora: Profª. Drª. Fernanda Faot - Universidade Federal de Pelotas - Doutora em Clínica Odontológica, Área de Prótese Dentária, pela Faculdade de Piracicaba – UNICAMP, Brasil.

Contato: Amália Machado Bielemann, amaliamb@gmail.com, Rua Gonçalves Chaves, 457

Apêndice C – Súmula do currículo do candidato

Comparação entre os marcadores inflamatórios no fluido crevicular peri-implantar e os parâmetros clínicos de saúde durante a osseointegração em desdentados totais.

Amália Machado Bielemann nasceu em 03 de outubro de 1989, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Completou o ensino fundamental e médio em Escola privada na mesma cidade. No ano de 2009 ingressou na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), tendo sido graduada cirurgiã-dentista em 2014. Durante a graduação, afim de, ter diferentes experiências além de aprimorar seus conhecimentos sempre esteve envolvida em projetos de extensão e de pesquisa. Já sob orientação da Prof^a. Dr^a. Fernanda Faot, foi bolsista de extensão durante 4 semestres. Ao finalizar a graduação, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), área de concentração Prótese Dentária, sob orientação do Prof^a. Dr^a. Fernanda Faot. Durante o período de mestrado foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação do Ministério da Educação (MEC), e desenvolveu trabalhos ligados a reabilitação oral de pacientes desdentados totais com overdentures mandibulares e de acompanhamento da saúde peri-implantar das mesmas.

Publicações:

Can Peri-implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of Peri-implantitis? A Systematic Review and Meta-analysis. Faot, Fernanda; Nascimento, Gustavo G. ; Bielemann, Amália M. ; Campão, Thiago D. ; Leite, Fábio R. M. ; Quiryren, Marc . Journal of Periodontology (1970), v. 86, p. 631-645, 2015.

Influence of Resin Cements on the Tension Force of Cast Frameworks Made by the Technique of Framework Cemented on Prepared Abutments. Perroni, Ana Paula ; Gomes, Érica Alves ; Bielemann, Amália Machado ; Baseggio, Bruna ; Federizzi, Leonardo ; Spazzin, Aloísio Oro ; Santos, Mateus Bertolini Fernandes Dos. Brazilian Dental Journal, v. 26, p. 390-392, 2015.

ANEXO - Carta do Comitê de ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DE OVERDENTURES MANDIBULARES NA EVOLUÇÃO DA FUNÇÃO MASTIGATÓRIA DE DEDENTADOS TOTAIS COM ATROFIA ÓSSEA

Pesquisador: Fernanda Facó

Area Temática:

Versão: 2

CAAE: 47353215.4.0000.5318

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/ FO-UFPel

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.267.086

Apresentação do Projeto:

Em virtude do aumento da expectativa de vida das populações em envelhecimento dos países em desenvolvimento, tem resultado no aumento da necessidade e substituição de próteses totais. O principal problema que acomete esta população é o processo de reabsorção óssea fisiológica, mais severa na mandíbula, resultando em problemas cada vez mais frequentes de retenção e estabilidade das próteses totais. Neste sentido, as "overdentures" implantosuportadas proporcionam um grande benefício a esses pacientes, aumentando a estabilidade e retenção e surtindo efeitos diretos na "performance" mastigatória, controle neuromuscular, e na qualidade de vida. Porém o custo efetivo desta intervenção bem como a severidade da atrofia óssea decorrente do tempo de edentulismo tem dificultado o acesso dos pacientes a esta modalidade de tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste estudo é avaliar a evolução da função mastigatória de pacientes com atrofia óssea mandibular severa antes e após a reabilitação com "overdentures" implantosuportadas, ancoradas em implantes de pequeno diâmetro.

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 457
Bairro: Centro CEP: 96.015-580
UF: RS Município: PELOTAS
Telefone: (53)3222-4439 Fax: (53)3222-4439 E-mail: cep.fop@gmail.com

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE**



Continuação do Parecer: 1.267.069

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e desconfortos mínimos. Benefícios incluem propor intervenções clínicas reabilitadoras que auxiliam na prevenção do processo de reabsorção óssea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores atenderam todas as solicitações do parecer anterior de forma satisfatória.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados de forma adequada.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS ANÁLISE DA RESPOSTA E ESCLARECIMENTO AO PARECER Nº1.201.436, O PROTOCOLO REAPRESENTADO FOI APROVADO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_512188.pdf	30/09/2015 14:00:45		Acelto
Outros	resposta_parecer.pdf	30/09/2015 13:59:50	Fernanda Faot	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Resposta.pdf	30/09/2015 13:56:21	Fernanda Faot	Acelto
Outros	Proposta de emenda.pdf	17/07/2015 17:50:29		Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto final.pdf	03/07/2015 09:03:16		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Final-Emenda CEP 2015.pdf	03/07/2015 09:01:31		Acelto
Outros	carta deresponsabilidade.pdf	03/07/2015 08:59:43		Acelto
Outros	carta de apresentação.pdf	03/07/2015 08:59:27		Acelto
Parecer Anterior	aprovação comitê de ética.jpg	13/05/2015		Acelto

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 457
 Bairro: Centro CEP: 96.015-560
 UF: RS Município: PELOTAS
 Telefone: (53)3222-4439 Fax: (53)3222-4439 E-mail: cep.fop@gmail.com