

Andreia Espíndola Vieira

Níveis de nitrito na saliva e no fluido peri-implantar em humanos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do Título de Mestre em Odontologia,
Área de Concentração em Cirurgia
e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Uberlândia, 2008

Andreia Espíndola Vieira

Níveis de nitrito na saliva e no fluido peri-implantar em humanos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do
Título de Mestre em Odontologia,
Área de Concentração em Cirurgia
e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza

Banca Examinadora:
Profa. Dra. Paula Dechichi
Profa Dra Janethe Deolina de Oliveira Pena
Profa Dra Maria das Graças Reis

Uberlândia
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V658n Vieira, Andreia Espíndola, 1984-

Níveis de nitrito na saliva e no fluido peri-implantar em humanos /
Andreia Espíndola Vieira. - 2008.

70 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Co-orientadora: Maria Aparecida de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Implantes dentários osseointegrados - Teses. I. Dechichi, Paula.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-089.843



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata Andreia Espíndola Vieira aprovada.

1. Profa. Dra. Paula Dechichi (Orientadora) _____

2. Profa Dra Janethe Deolina de Oliveira Pena _____

3. Profa Dra Maria das Graças Reis _____

Dedico essa conquista à Deus,
à minha família que tanto amo,
meus pais, José Luiz e Dalva,
meus irmãos, Aline e Zé Luiz Neto,
à minha cunhada Adriana e
aos meus queridos vovô Zé e vovó Maria.

Agradecimentos

“Àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo que pedimos ou pensamos...a Ele seja a Glória” Ef. 3:20 e 21

À Deus, minha imensa e eterna gratidão, pela fidelidade dEle em todos os momentos da minha vida. Ele que é a razão do meu existir, esse Deus maravilhoso que nos constrange com seu amor incondicional e que nunca nos abandona, sejam quais forem às circunstâncias. É impossível olhar para trás, sem perceber que a sua mão de poder esteve cuidando de cada detalhe. Ao Senhor em quem eu sei que posso confiar e que faz com que todas as coisas cooperem para o bem daqueles que o amam, no seu devido tempo.

Essa vitória jamais teria sido alcançada, se eu não pudesse contar com pessoas tão especiais e que foram fundamentais para a concretização desse sonho. O mestrado na verdade, é apenas mais uma etapa, de uma jornada que começou muito antes.

Aos meus amores, meus pais José Luiz e Dalva, os quais nem mesmo a distância consegue afastar e que, com simples palavras, já são capazes de me animar e me incentivar a prosseguir. Serei eternamente grata por serem meu alicerce em todos os momentos da minha vida.

À minha querida irmã caçula Aline, ao meu irmão mais velho Zé Luiz Neto e minha querida cunhada Adriana. Vocês que conviveram comigo todos esses anos, e que conhecem bem os meus defeitos, mas também as minhas qualidades. Recebam de coração o meu muito obrigada, por tudo mesmo.

Aos meus queridos, Vovô Zé e Vovó Maria, por tudo que representam para mim.

Aos meus padrinhos, Tio Carlos e Tia Darci, suas filhas e seus esposos, que sempre foram amorosos e atenciosos, e se colocavam à disposição quando precisávamos.

Aos meus Tio Zé Espíndola e Tia Nereide, e suas filhas Isabela, Silvânia e Suélen, que me acolheram como filha quando cheguei à Uberlândia. Jamais esquecerei todo carinho e tudo que fizeram por mim.

Aos meus Tio Baltazar e Tia Maria Helena, e seus filhos Fernanda, Luciana e Márcio, pelo carinho, atenção e consideração.

Aos demais familiares pelo carinho, consideração e incentivo. E em especial à minha prima Silvinha que se foi recentemente, deixando saudades e o exemplo de uma pessoa alegre, determinada, batalhadora, que soube correr atrás dos seus sonhos, tornando-se bem-sucedida mesmo partindo tão jovem. Ela que se foi tão rápido, não deixou ao menos que nos despedíssemos direito. Ainda não estávamos preparados pra dizer “Adeus”, não tão cedo, mas a verdade é que jamais estaríamos. No entanto, há certas coisas que não cabe à nós explicarmos e nem questionarmos, apenas com tristeza aceitarmos e tentaremos nos conformar. “É pena q o último ato do nosso tempo na terra seja morrer, porque a morte teria tantas coisas a nos ensinar sobre a vida...”

À minha querida orientadora, Profa Dra Paula Dechichi, que com certeza foi muito mais que uma amiga, mas uma verdadeira mãe em todos os sentidos. Nesses 7 anos de convivência não tenho do que me queixar, somente agradecer. Ela que tem me acompanhando desde o meu 2º período de graduação, ainda adolescente. E desde então, tem sido meu exemplo tanto de conduta profissional, quanto pessoal e um grande apoio em todos esses anos. Com certeza foram muito mais do que ensinamentos científicos, foram lições de vida a serem aplicadas a todo o momento. Ajudou-me a dar passos essenciais em minha caminhada. Uma grande incentivadora e que participou de muitas de minhas conquistas, contribuindo imensamente para o meu crescimento e amadurecimento. Uma pessoa de caráter e índole admiráveis, cuja simplicidade e humildade, não são capazes de esconder sua imensa competência como professora, orientadora e em tudo mais que se propõe a fazer. Capaz de cativar a todos com a sua ternura, seu jeito meigo e educado de falar, medindo sempre as palavras com muita sabedoria e franqueza,

transformando as mais duras lições, em sábios e agradáveis ensinamentos. E que mesmo diante das situações mais adversas e complexas, mantêm-se forte e sensata. Apesar de suas inúmeras ocupações, ainda consegue encontrar tempo para nos ouvir e atender, com atenção e pacientemente. À quem devo grande parte do que aprendi e com quem ainda tenho muito o que aprender, e que sempre terá minha eterna admiração e sincera gratidão por tudo.

À minha co-orientadora Profa Dra Maria Aparecida de Souza, carinhosamente conhecida como Cida. Agradeço por sua atenção, e pelos seus ensinamentos e orientações durante esse trabalho, principalmente na parte experimental, a qual domina com grande propriedade. Sua sabedoria, experiência e simplicidade fazem dela uma pessoa querida e muito bem conceituada.

À minha grande amiga Camilla Moura, que se tornou uma irmã e quase uma mãe também. Tem sido uma grande companheira desde que começamos a trabalhar juntas, quando eu ainda estava na graduação e iniciei na pesquisa. Aprendi muito com o seu dinamismo e coragem de enfrentar os desafios de forma destemida e sempre com muito esforço e dedicação. Uma pessoa simples, sincera, inteligente e de grande talento e potencial. Juntamente com a minha orientadora, a Camilla sempre foi uma grande incentivadora e que participou de muitas de minhas conquistas, contribuindo imensamente para o meu crescimento e amadurecimento. Entre outras coisas, ela foi fundamental para a concretização desse trabalho.

Ao Professor Darcey que tão gentilmente disponibilizou seu consultório e seus pacientes para essa pesquisa.

Às secretárias do consultório, Cida, Gil, Bianca e Renata, pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao meu grande amigo Gustavo Rabelo, que muito me ajudou para que eu pudesse conciliar as atividades na graduação com o mestrado.

Àqueles que já passaram por aqui um dia, e se tornaram grandes e queridos amigos: Jonas Dantas, Lucieni Campoli, Márcia Hatakeama, Patrícia e Elisângela.

Aos queridos amigos do mestrado: Nara, Bianca, Ana Cláudia, Francielle, Luciano, Charles, Rafaela, Marcelo, Lia, Tânia, Leonardo e demais colegas, pela agradável convivência durante esse período.

Aos professores do mestrado acadêmico em Odontologia, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso.

Às secretárias Abigail, Cidinha, Flaviane, Giselda e Soraya pelos serviços prestados.

Aos queridos professores da Histologia e atualmente meus colegas de trabalho: Profa Eloísa Ferro, Prof Marcelo Beletti, Profa Neide, Profa Zenaide, Profa Márcia, Prof Gladstone, Prof Marco Aurélio, Prof Marcos Silva e Profa Belissa. Por serem muito prestativos e me acolherem, desde a graduação, iniciação científica, mestrado e agora como Profa Substituta, com os quais tenho aprendido muito.

Aos meus amigos do Laboratório de Histologia: Angélica, Carla, Lorena, Mariana, Belissa, Idessânia, Karen, Raquel, pela convivência agradável durante todos esses anos.

Aos queridos alunos de iniciação Flaviana, Lara e Cláudio pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos do laboratório de Histologia: Hégio, Richard, Rui e Thiago, e a secretária Juscélia, pela cooperação sempre que solicitados e que durante essa caminhada se tornaram meus amigos.

Aos Professores da Imunologia, em especial à Profa Dra Janethe, Profa Dra Deise e ao Prof Dr Mineo, pela atenção e cooperação quando solicitados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Fernanda, Alexandre, Cristiano, Patrícia e Renata.

Aos meus colegas e amigos da 52ª turma pelo convívio durante a graduação e que deixaram saudades. E mesmo nas poucas vezes que nos reencontramos sempre temos muitas histórias e ricas experiências para compartilhar e aprender uns com os outros. Especialmente os meus eternos companheiros Priscilla, Jalber, Giselle, Thiago Marques, com os quais mantenho mais contato e partilhamos dos mesmos anseios.

Aos alunos da 64ª e 65ª turmas do curso de Odontologia, minhas primeiras turmas como Professora de Histologia Especial, pelo carinho e respeito.

Aos meus eternos amigos da ABU (Aliança Bíblica Universitária) de Uberlândia e outras cidades pelos momentos edificantes e também de descontração.

Aos meus amigos da Igreja Metodista de Uberlândia e de outras cidades, pela amizade e pelos divertidos momentos que compartilhamos.

À minha grande amiga Roberta, seu esposo Gilberto e suas filhas Isabela e Bianca, e que hoje são mais do que amigos, são verdadeiros irmãos.

Aos pacientes pela cooperação e sem os quais este trabalho não seria possível.

Enfim o meu carinho e sinceros agradecimentos, à todos que de uma forma ou de outra, contribuíram na execução deste trabalho. Pois o mais importante em nossas conquistas é sabermos reconhecer o valor de todos aqueles que estiveram conosco nesses momentos.

“Grandes coisas o Senhor tem feito por nós por isso estamos alegres”.

Salmos 126:3

“Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando se está escalando-a”

William Shakespeare

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Sabino

"A utopia está lá no horizonte. Aproximo-me dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar."

Eduardo Galeano

“Não existem atitudes perfeitas, existem perfeitas intenções”.

“Pouco conhecimento faz com que as criaturas se tornem orgulhosas. Muito conhecimento faz com que se tornem humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

“A beleza da vida está em desfrutar de cada vitória alcançada, de cada obstáculo ultrapassado com esforço e dedicação e de cada sonho realizado, lembrando sempre do grande Pai Celeste que, com amor e fidelidade, tem cuidado de nós e proporcionado oportunidades de comemorarmos isso junto àqueles que amamos.”

Andreia Espíndola Vieira

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. Introdução.....	4
2. Revisão da literatura.....	7
2.1. Periodonto.....	7
2.1.1. Periodonto de Inserção.....	7
2.1.2. Periodonto de Proteção.....	11
2.2. Implantodontia.....	15
2.2.1. Mucosa Peri-implantar.....	16
2.3. Doença Periodontal e Peri-implantar.....	18
2.4. Defesa da Cavidade Oral.....	22
2.4.1. Fluido sulcular gengival e peri-implantar.....	22
2.4.2. Saliva.....	27
2.5. Óxido Nítrico.....	32
3. Proposição.....	35
4. Material e métodos.....	36
4.1. População.....	36
4.1.1. Seleção dos indivíduos.....	36
4.2. Procedimentos clínicos e radiográficos.....	36
4.2.1 Obtenção das amostras de saliva.....	37
4.2.2 Coleta do fluido sulcular.....	37

4.2.3 Sondagem do sulco gengival.....	38
4.2.4 Exame radiográfico.....	39
4.2.5 Classificação dos sítios periodontais e peri-implantares.....	39
4.3. Procedimentos laboratoriais.....	40
4.3.1 Dosagem de Nitrito (NO_2^-) pelo método de Griess.....	40
4.4 Análise estatística.....	41
5. Resultados.....	42
5.1. Dados Clínicos.....	42
5.2. Níveis totais de nitrito.....	44
5.2.1. Nível total de nitrito no fluido sulcular (FS) e na saliva.....	44
5.3. Análises das correlações entre grupos saudável e doente.....	45
5.3.1. Correlação entre achados clínicos e nível total de nitrito.....	45
5.3.2. Correlação entre os níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular...	46
6. Discussão.....	51
7. Conclusão.....	60
Referências.....	61
Anexo.....	69
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	70

Lista de Abreviaturas e Símbolos

SFA	Substância Fundamental Amorfa
FS	Fluido Sulcular
FSPI	Fluido Sulcular Peri-implantar
PV	Placa visível
PS	Profundidade de sondagem
SS	Sangramento à sondagem
DV	Disto vestibular
VC	Vestibular central
MV	Mesial vestibular
DL	Disto lingual
LC	Lingual central
ML	Mesio lingual
NO	Óxido Nítrico
NOS	NO sintases
NO_2^-	Nitrito
O_2^-	Superóxido
ONOO	Peroxinitrito
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
PGE2	Prostaglandina E2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGF	Fator de Crescimento Transformante
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
MMP	Metaloproteinases
AMP cíclico	Adenosina Monofosfato Cíclico
G	Aceleração da gravidade
DP	Desvio padrão
r	Coeficiente de Correlação

Resumo

O óxido nítrico tem papel importante na resposta inflamatória do hospedeiro. Entretanto, seu potencial como possível ferramenta no diagnóstico de doenças peri-implantares tem sido pouco investigado. O presente estudo teve como objetivo determinar os níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular peri-implantar (FSPI), de pacientes parcialmente desdentados, portadores de implantes dentais, e verificar as correlações entre esses níveis e parâmetros clínicos. Participaram do estudo vinte e quatro indivíduos separados em dois grupos de acordo com a condição clínica da mucosa periimplantar. No grupo saudável a mucosa periimplantar não apresentava nenhuma alteração clínica, enquanto no grupo doente havia mucosite. Esta avaliação foi realizada de acordo com parâmetros clínicos: profundidade de sondagem (PS), sangramento durante a sondagem (SS) e presença de placa visível (PV). No mesmo indivíduo, para cada implante (mucosa periimplantar) havia um dente, com gengiva marginal saudável, como controle. Foram coletados saliva e fluido sulcular (FS) em torno dos dentes (controle intrínseco) e dos implantes dentários, e os níveis de nitrito foram avaliados pelo método de Griess. Os níveis de nitrito na saliva e no FS dos indivíduos foram comparados e avaliadas suas correlações com os parâmetros clínicos. Os dados clínicos SS e PV foram mais elevados nos implantes quando comparados com os dentes controles, mas não mostraram significância ($p>0,05$), com exceção da PS. Não foram observadas diferenças no nível total de nitrito na saliva e no FS dos grupos saudável e doente ($p>0,05$). Os dentes e os implantes dos grupos saudável e doente não mostraram diferença estatística em relação aos níveis de nitrito ($p>0,05$). A correlação entre os parâmetros clínicos e os níveis de nitrito na saliva ou FS não foi observada nos grupos saudável e doente, exceto para PV nos implantes do grupo saudável ($p=0,031$; $r=-0,72$). Estes resultados confirmaram a similaridade entre os sítios periodontais e peri-implantares. De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos, é possível concluir que o nível de nitrito presente no fluido peri-implantar e na saliva não apresenta correlação com os parâmetros clínicos de avaliação da mucosa peri-implantar.

Abstract

Nitric oxide has an important effect on host response. However its potential as a possible diagnostic tool in peri-implant disease has been little studied. In this study the nitrite levels in saliva and peri-implant sulcular fluid (PISF) of partially edentulous patients and the possible correlation between these levels and clinical parameters were determined. Twenty four patients were examined to determine the peri-implant status (healthy or diseased) based on probing depth (PD), bleeding on probing (BOP) and presence of visible plaque (VP). Saliva and sulcular fluid (SF) around teeth (internal control) and dental implants were collected and the nitrite levels were evaluated by the Griess method. Nitrite levels in saliva and SF of these patients were compared and their correlations with clinical parameters were evaluated. Clinical data (BOP and VP) were higher in implants than in matching control teeth, but did not show significance ($p>0.05$) with the exception of PD. Differences in total nitrite levels in saliva and SF of healthy and diseased groups were not observed ($p>0.05$). Teeth and implants of healthy or diseased groups did not demonstrate statistical difference regarding nitrite levels ($p>0.05$). Correlation between clinical parameters and nitrite levels in saliva or SF was not observed in healthy or diseased groups except for VP in implants of the healthy group ($p=0.031$, $r=-0.72$). These results demonstrated similarity between dental sites and implants. The present findings do not allow the use of nitrite as a diagnostic tool for peri-implant disease, in patients with slight inflammation.

Palavras-chaves: Nitrito, óxido nítrico, Saliva, Fluido sulcular, Fluido peri-implantar, mucosa periimplantar

1. Introdução

Os implantes osseointegrados representam um importante avanço da odontologia moderna, apresentando uma alta taxa de sucesso. Entretanto, ainda ocorrem perdas de implantes, tanto nas fases iniciais, durante o período de cicatrização, bem como nas fases tardias, após os implantes estarem em função mastigatória (Liskman *et al.*, 2004).

Estudos longitudinais têm mostrado baixos índices de fracasso, relacionados principalmente à falta de habilidade e motivação dos pacientes em controlar fatores etiológicos responsáveis pela instalação e progressão da inflamação nos tecidos peri-implantares (Murata *et al.*, 2002; Leonhardt *et al.*, 2002; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Liskmann *et al.*, 2004). Em geral, as doenças peri-implantares estão relacionadas à presença de placa bacteriana, com ou sem sobrecarga (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Liskmann *et al.*, 2004).

A instalação de uma inflamação inicial, restrita apenas aos tecidos moles que circundam os implantes é denominada mucosite. Este processo pode evoluir rapidamente para uma inflamação severa, conhecida como peri-implantite, que é caracterizada pela destruição do osso de suporte e dos tecidos moles adjacentes, levando conseqüentemente à perda de inserção do implante (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Yalçın *et al.*, 2005).

A evolução dos processos inflamatórios peri-implantares é mais rápida que os periodontais. Portanto, o monitoramento dos implantes dentais é ponto crítico para a prevenção e detecção precoce da inflamação, sendo essencial no tratamento da doença e na manutenção dos implantes (Paolantio *et al.*, 2000; Yalçın *et al.*, 2005). Dentre os critérios utilizados para avaliação da saúde peri-implantar incluem-se a avaliação radiográfica, a presença de sangramento à sondagem, a determinação da profundidade de sondagem e o grau de mobilidade (Murata *et al.*, 2002; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Liskmann *et al.*, 2004). O implante é considerado clinicamente saudável se não houver sangramento ou mobilidade, associada à dor ou desconforto, e os tecidos peri-implantares apresentarem aspecto de

normalidade (Watzek, 2004). O exame radiográfico permite avaliar a altura da crista óssea em relação ao implante, possibilitando acompanhar a osseointegração ao longo do tempo.

No entanto, esses parâmetros clínicos são limitados, uma vez que só revelam o grau de destruição promovido pela doença após sua manifestação clínica (Paolantonio *et al.*, 2000; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b), não permitindo observar alterações iniciais no sítio peri-implantar, como reabsorção relacionada à peri-implantite (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Yalçın *et al.*, 2005). Assim, atenção especial tem sido dada a métodos de diagnóstico complementares, que possibilitem avaliar mudanças na condição de saúde peri-implantar, em estágios não detectáveis em exames clínicos e radiográficos, ou seja, previamente a uma perda óssea irreversível (Liskmann *et al.*, 2004, Yalçın *et al.*, 2005).

A cavidade oral possui mecanismos de defesa presentes na saliva e no fluido crevicular que participam tanto da imunidade inata como da imunidade adaptativa (Walker, 2004). Frente a um processo inflamatório, tanto à saliva, quanto o fluido, sofrem alterações na sua composição (Tenovuo, 2002; Ozmeric, 2004). Essas alterações têm sido investigadas em várias doenças que afetam a cavidade oral, embora ainda não sejam utilizadas como ferramentas de diagnóstico na prática clínica (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Liskman *et al.*, 2004).

O fluido crevicular é formado por um filtrado sanguíneo que contém células de defesa do hospedeiro e elementos do metabolismo das bactérias ali localizadas (Goodson, 2003). Esse fluido contém uma variedade de macromoléculas derivadas do soro e do interstício da gengiva, apresentando inclusive componentes do sistema imune, como imunoglobulinas e citocinas (Ebersole, 2003).

Ferramentas de diagnóstico baseadas em marcadores biológicos presentes na saliva e no fluido sulcular, tem sido extensivamente pesquisadas nas doenças periodontais (Kaufman & Lamster 2000; Murata *et al.*, 2002; Ebersole, 2003; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Ozmeric 2004; Berglundh *et al.*, 2005; Loos & Tjoa 2005, Yalçın *et al.*, 2005). As

similaridades entre o microambiente dos sítios periodontal e peri-implantar, levaram os pesquisadores a investigarem na mucosa peri-implantar os mesmos marcadores utilizados no diagnóstico das periodontites (Paolantonio *et al.*, 2000; Liskmann *et al.*, 2004; Yalçın *et al.*, 2005), o que tornaria essa análise viável também para a implantodontia, no acompanhamento longitudinal dos implantes (Yalçın *et al.*, 2005). Um dos marcadores estudados é o óxido nítrico, o óxido nítrico possui função regulatória na inflamação

O óxido nítrico é uma molécula altamente reativa e com múltiplas funções, envolvida nos mecanismos fisiopatológicos da região periodontal (Siqueira Jr & Sabóia Dantas, 2000; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006). Nos tecidos periodontal e peri-implantar e na saliva, este parece fazer parte de um mecanismo de defesa não-específica contra bactérias patogênicas (Brennan *et al.*, 2003). No entanto, a toxicidade do NO não está restrita aos microorganismos (Gyurko *et al.*, 2005), uma vez que quantidades excessivas de NO podem contribuir para a destruição tecidual nos sítios periodontal e peri-implantar (Leitão *et al.*, 2005; Tozum *et al.*, 2005; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006; Liskmann *et al.*, 2007; Wiley, 2007; Tozum *et al.*, 2007; Tozum *et al.*, 2008).

O nitrito é um metabólito final da oxidação do NO, e por ser um produto estável, tem sido frequentemente usado como marcador da inflamação (Leitão *et al.*, 2005; Gyurko *et al.*, 2005; Tozum *et al.*, 2005). Portanto, quantificações dos níveis de nitritos salivares e do fluido sulcular peri-implantar associados aos parâmetros clínicos podem ser úteis no diagnóstico precoce de alterações no sítio peri-implantar e na determinação do prognóstico dos implantes.

2. Revisão da Literatura

2.1. Periodonto

O periodonto é o conjunto de tecidos localizados ao redor do dente que formam o órgão de sustentação e proteção do elemento dentário, sendo suas principais funções inserir o dente no osso da mandíbula e maxila e manter a sua integridade (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006).

De acordo com a função, o periodonto se divide em: periodonto de inserção e periodonto de proteção. O primeiro também conhecido como periodonto de sustentação é constituído pelo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, formando uma unidade estrutural e funcional responsável pela fixação ou ancoragem do dente ao alvéolo. Já o periodonto de proteção compreende duas regiões: a gengiva marginal, que recobre a crista do processo alveolar, formando um colar ou anel ao redor do colo do dente e a junção dentogengival, porção que estabelece continuidade da mucosa oral com o elemento dental (Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

2.1.1. Periodonto de Inserção

Os componentes do periodonto de inserção desenvolvem-se simultaneamente, a partir de células ectomesenquimais do folículo dental, dependendo da formação prévia de dentina radicular e da presença da bainha epitelial radicular de Hertwig. O periodonto de inserção é formado durante a fase em raiz da odontogênese e, à medida que ocorre a formação da dentina radicular, inicia-se o processo de erupção dental (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004)

Os tecidos de suporte formam uma articulação fibrosa especializada chamada de gonfose, em que as fibras colágenas do ligamento periodontal se inserem no cemento e no osso que reveste o alvéolo dental. Essa articulação aveolodentária é que mantém o dente em seu alvéolo, permitindo que o mesmo suporte às forças da mastigação (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006)

O cemento é um tecido conjuntivo mineralizado que reveste a dentina radicular, tendo como função principal inserir as fibras do ligamento periodontal. Muito semelhante ao tecido ósseo, o cemento possui 50 a 60% de matriz inorgânica, constituída por fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Já sua matriz orgânica é composta principalmente por fibras colágenas do tipo I e proteínas não-colágenas (osteopontina, sialoproteína óssea, etc.). Os componentes celulares são os cementoblastos, células que revestem a superfície do cemento e sintetizam sua matriz orgânica, e os cementócitos, que são cementoblastos que foram aprisionados na matriz do cemento durante sua formação. Os cementócitos são células com baixa atividade metabólica e que estabelecem comunicações entre si através de canálculos. A vitalidade dessas células depende da difusão dos nutrientes essenciais a partir dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, uma vez que o cemento é um tecido avascular (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Há dois tipos de cemento, o cemento acelular, formado por delgada camada adjacente à superfície da dentina radicular; e o cemento celular, que contém os cementócitos e geralmente localizado no terço apical da raiz. Este último possui um importante papel de adaptação em resposta ao desgaste e movimento dos dentes (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Outro componente do periodonto de inserção é o ligamento periodontal, um tecido conjuntivo frouxo atravessado por grossos feixes de fibras colágenas do tipo I que se inserem no cemento e no osso alveolar. Esse tecido possui uma espessura variável de 0,15 a 0,38mm, sendo mais delgado no terço médio da raiz. Sua espessura sofre diminuição progressiva com a idade, em toda sua extensão (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A principal função do ligamento periodontal é suportar o dente no seu alvéolo e, ao mesmo tempo, permitir que ele resista e amorteba o impacto das forças mastigatórias. Além de articular o dente com osso, o ligamento, através dos seus receptores sensoriais proprioceptivos e dos seus

mecanorreceptores, desempenha importante papel no posicionamento e na acomodação dos arcos dentários durante os movimentos funcionais do sistema estomatognático (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Como todo tecido conjuntivo propriamente dito, o ligamento periodontal é composto por células contidas no compartimento extracelular de fibras e substância fundamental amorfa (SFA). A célula mais abundante neste tecido é o fibroblasto, responsável pela síntese, remodelação e degradação das fibras colágenas, bem como a síntese da SFA. Além dos fibroblastos, estão presentes células ectomesenquimais indiferenciadas, restos epiteliais de Malassez, além de células de defesa, como macrófagos e mastócitos (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A porção fibrilar da matriz extracelular é constituída principalmente por fibrilas colágenas tipo I. Muitas dessas fibrilas agrupam-se formando fibras, as quais podem formar feixes de fibras característicos do ligamento e que são chamados de fibras principais. De acordo com a orientação ou região da raiz onde se inserem, essas fibras são classificadas em cinco grupos: o da crista alveolar; o horizontal ou de transição; o oblíquo; o apical e o inter-radicular. Além das fibras principais, existem as fibras secundárias, que não se entrelaçam e, portanto não chegam a formar grossos feixes e nem apresentam orientação regular. No ligamento também são encontrados fibras reticulares e duas formas imaturas de fibras elásticas que são as oxitalânicas e as elauninas (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Semelhante aos demais tecidos conjuntivos a SFA do ligamento é constituída por grande quantidade de água, além de proteoglicanas e glicosaminoglicanas, glicoproteínas e alguns lipídeos. Além do seu papel estrutural, a SFA atua como amortecedor hidráulico ante as forças e pressões as quais o complexo dente-periodonto está sujeito (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Devido ao seu alto metabolismo, com rápida renovação (turnover) e remodelação dos constituintes de sua matriz, o ligamento é um tecido com

abundante irrigação (Avery, 2001; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Assim como os demais componentes do periodonto de inserção, o ligamento periodontal inicia sua formação durante a fase em raiz. No entanto, durante o processo eruptivo e a rizogênese, os feixes de fibrilas colágenas à medida que estão sendo formados, sofrem modificações no seu arranjo e na sua disposição. A orientação dos fibroblastos e, consequentemente, dos feixes colágenos muda notavelmente, principalmente no terço cervical. Portanto, o ligamento periodontal só atinge sua estrutura final após o término da erupção, quando o dente entra em contato com o seu antagonista e recebe forças funcionais correspondentes (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004).

Outra estrutura que compõe o periodonto de inserção é o osso alveolar, um tecido conjuntivo mineralizado que reveste os alvéolos dos processos maxilares. A principal característica desse tecido é a quantidade de feixes de fibras colágenas nele inseridas, que são as fibras de Sharpey. Estas fibras estão orientadas perpendicularmente à superfície, e conferem ao osso um aspecto fasciculado (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

O tecido ósseo possui rigidez e dureza proporcionada por sua porção inorgânica que corresponde a cerca de 60% da matriz extracelular. Sendo o restante constituído por água e componentes orgânicos, o que conferem certo grau de elasticidade e resistência às fraturas (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006). Cerca de 90% da matriz orgânica é constituída por colágeno tipo I e o restante por substâncias não-colágenas. As células que constituem o tecido ósseo são: os osteoblastos que sintetizam, secretam e mineralizam a matriz orgânica; os osteócitos, células aprisionadas no interior de lacunas, que constituem uma rede celular comunicando-se por canalículos e que mantêm a integridade da matriz; os osteoclastos, células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea; além das células osteoprogenitoras (Avery, 2001; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

O osso alveolar é classificado histologicamente como um osso primário ou imaturo, isto é, suas fibrilas colágenas não apresentam uma organização bem definida, possuindo um maior número de osteócitos incluídos na matriz óssea e um menor conteúdo mineral quando comparado a um osso maduro. Essa classificação se deve ao fato de que o osso alveolar é extremamente dinâmico, com grande plasticidade, respondendo rapidamente os estímulos que induzem formação e reabsorção tecidual (Avery, 2001; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

2.1.2. Periodonto de Proteção

O periodonto marginal ou de proteção é uma porção especializada da mucosa oral, denominada gengival marginal ou livre, que forma um colar ou anel circundando o colo do dente, próximo ao limite amelocementário. Esse colar possui uma face voltada para a cavidade bucal e que reveste os processos ou rebordos alveolares e outra face voltada para o dente, denominada junção dentogengival (Avery, 2001; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A principal função do periodonto de proteção é promover a adesão, estabelecendo uma continuidade entre a mucosa oral e a superfície da coroa dental. Dessa forma, constitui uma barreira biológica à medida que promove o vedamento do meio externo com o meio interno, protegendo não só as estruturas do periodonto de sustentação como também as demais estruturas internas (Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Por ser uma porção de mucosa oral, a gengiva marginal possui uma dupla origem embriológica, sendo constituída por epitélio derivado do ectoderma que reveste a cavidade oral primitiva, e conjuntivo subjacente, originado do ectomesênquima (Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

O epitélio é dividido em três partes funcionais: o epitélio gengival ou da vertente externa; o epitélio do sulco ou sulcular e o epitélio juncional ou epitélio de fixação. E o tecido conjuntivo, ou lâmina própria, apresenta duas

regiões, uma superficial e outra profunda (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A porção voltada para a cavidade oral é revestida pelo epitélio gengival ou da vertente externa. Essa região está sujeita diretamente ao atrito dos alimentos durante a mastigação, sendo parte da mucosa mastigatória, revestida por epitélio estratificado pavimento queratinizado. Sua interface com o conjuntivo é bastante irregular apresentando várias projeções papilares de conjuntivo entre cristas epiteliais.

A região voltada para o dente é a junção dentogengival, constituída pelo epitélio juncional, pelo sulco gengival e pelo epitélio que reveste esse sulco. O sulco gengival é uma estreita fenda situada entre o dente e a gengiva livre, que se estende da crista da margem gengival até o limite coronário do epitélio juncional. Trata-se de um sulco raso, cuja profundidade pode variar de 0,5 a 3mm, sendo, em média 1,8mm (Itoiz & Carranza, 1997; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004)

O sulco gengival é revestido por um epitélio estratificado pavimentoso não-queratinizado. A interface entre o epitélio do sulco e a lâmina própria subjacente é mais regular apresentando pequenas papilas. Como não existe aderência entre o epitélio do sulco e a superfície dentária, essa região é banhada por um fluido crevicular.

O epitélio juncional geralmente é mais largo no assoalho do sulco gengival, onde contém de 15 a 30 células de espessura, torna-se mais delgado à medida que progride em sentido apical, isto é, em direção ao limite amelocementário, chegando a atingir uma espessura final de três a quatro células. A interface com o conjuntivo subjacente é bastante retilínea, não apresentando ondulações.

Basicamente o epitélio juncional possui dois estratos: o basal, próximo à lâmina própria e o suprabasal. O estrato basal é constituído por uma única camada de células cúbicas e, como em todos os epitélios, essas células se dividem constantemente, constituindo a porção germinativa, responsável pela proliferação do epitélio. As células do epitélio juncional são renovadas num período de quatro a sete dias, sendo descamadas para a região do sulco

gingival, portanto o epitélio juncional possui alto índice de renovação (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

O estrato suprabasal é formado por camadas de células achatadas, dispostas paralelamente à superfície da coroa dental. Essas células estão unidas entre si por um escasso número de desmossomos, quando comparado com os epitélios de outras regiões da gengiva. Isso determina a existência de amplos espaços intercelulares, conferindo grande permeabilidade ao epitélio juncional, o que permite a passagem de líquido tissular e células inflamatórias da lâmina própria para a região do sulco gengival, onde irão constituir o fluido crevicular (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Devido à imaturidade do epitélio juncional, as células superficiais do estrato suprabasal formam uma lâmina basal interna e hemidesmossomos que garantem a aderência epitelial da gengiva à superfície dental. Diferentemente das demais camadas do epitélio juncional, essas células superficiais possuem um baixo índice de renovação, a fim de não comprometer a adesão da gengiva ao dente (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

O tecido conjuntivo possui propriedades indutoras que desempenham papel importante na determinação da expressão epitelial, principalmente quanto à maturação do epitélio. No periodonto de proteção, o conjuntivo da mucosa, também conhecido como lâmina própria, é dividido em conjuntivos superficial e profundo (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006).

O conjuntivo superficial, localizado subjacente aos epitélios gengival e sulcular, instrui a maturação normal desses em epitélios estratificados pavimentosos. Já o conjuntivo profundo, localizado abaixo do epitélio juncional, possui apenas fatores necessários para a manutenção deste epitélio, conferindo-lhe características peculiares. Uma delas, já mencionada, é a imaturidade do tecido, uma vez que o conjuntivo subjacente não induz a maturação do epitélio juncional, este permanece como epitélio imaturo (Ten Cate, 2001).

Outro fator que influencia na expressão epitelial é o infiltrado inflamatório presente no conjuntivo. Pois, em adultos, mesmo gengivas clinicamente saudáveis, apresentam leve grau de inflamação na lâmina própria associada à junção dentogengival, provavelmente iniciada quando o dente irrompe na cavidade oral. Esse infiltrado inflamatório justificaria o fato do epitélio sulcular não ser queratinizado, enquanto que o epitélio gengival apresenta-se queratinizado, embora ambos sejam sustentados pelo mesmo conjuntivo (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006).

A inflamação da lâmina própria, além de aumentar a capacidade proliferativa do epitélio juncional, ainda mantém um gradiente de células inflamatórias, especialmente polimorfonucleares, que migram continuamente por entre os espaços intercelulares do epitélio sulcular, mas principalmente do epitélio juncional. Acredita-se que chegam a migrar do conjuntivo para o sulco gengival, cerca de três mil neutrófilos por minuto, além de alguns linfócitos e monócitos, células estas que irão constituir o fluido crevicular. Esse fluxo de células de defesa garante ao organismo um monitoramento, que no caso da entrada de qualquer agente estranho, já está preparado para atuar com a sua primeira linha de defesa (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004).

O tecido conjuntivo ou lâmina própria da gengiva marginal é do tipo denso, possui grossos feixes de fibras colágenas, que constituem o ligamento gengival. De acordo com sua localização e orientação, essas fibras principais da gengiva dividem-se em seis grupos: as dentogengivais; as dentoperiostais; as alvéologengivais; as circulares; as interpapilares e as transeptais, também conhecidas como interdentárias ou dentodentais. Além das fibras principais que constituem os grossos feixes, existem também as fibras colágenas secundárias dispostas de maneira irregular na matriz. Essa grande quantidade de fibras confere à gengiva livre uma consistência firme e resistência ao deslocamento (Avery, 2001; Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

2.2. Implantodontia

A implantodontia representa um grande avanço da Odontologia moderna. A busca por um substituto do elemento dental perdido levou ao desenvolvimento de diferentes sistemas de implantes, como os implantes agulhados, subperiostais e laminados, utilizando diversos tipos de materiais.

Os primeiros implantes odontológicos baseavam-se no empirismo e fracassaram devido à falta de estudos clínicos e científicos controlados. Entretanto, na década de 60, Branemark e colaboradores, fundamentados em pesquisas básicas e clínicas, iniciaram o desenvolvimento de um novo sistema de implantes. Este sistema fundamentava-se na ancoragem direta do implante no tecido ósseo, sem a interposição de tecido mole, formando uma espécie de anquilose, fenômeno este, denominado osseointegração, (Amarante & Lima, 2001; Simon & Watson, 2002; Franchi *et al.*, 2005). Inicialmente não foi possível demonstrar o fenômeno de osseointegração devido à ausência de equipamentos que permitissem cortar o tecido ósseo, sem a remoção do implante metálico, o que só foi demonstrado claramente por Shroeder *et al.* em 1976 (Davies, 2003; Amarante & Lima, 2001).

Estudos longitudinais demonstraram altas taxas de sucesso com os implantes de titânio desde que empregados adequadamente (Adell *et al.*, 1981; Davies, 2003). Novos sistemas de implantes foram desenvolvidos, baseados no protocolo original de Branemark e colaboradores, com variações no desenho do parafuso, composição do titânio, topografia e tratamento de superfície (Amarante & Lima, 2001; Brunette & Chehroudi, 1999; Davies, 2003; Li *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005). Entretanto, ainda ocorrem perdas de implantes tanto nas fases iniciais, durante o período de cicatrização, quanta nas fases tardias, isto é, após o período de osseointegração e instalação da prótese (Liskmann *et al.*, 2004).

As perdas tardias podem estar relacionadas à falhas durante a confecção da prótese, ocasionando excesso de carga, a hábitos parafuncionais, má higienização e problemas sistêmicos como diabetes (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Watzek, 2004). O tabagismo também tem sido

apontado como um dos possíveis responsáveis pelo fracasso de implantes, embora muitos fatores relacionados ao comportamento da doença peri-implantar, tanto sistêmico como local, ainda não estejam esclarecidos (Watzek, 2004).

Para avaliar os diferentes sistemas de implantes em função, são utilizadas avaliações clínicas e radiográficas. Clinicamente um implante é considerado com sucesso se não for observada mobilidade associada à dor ou desconforto, ausência de sangramento e aparência saudável dos tecidos peri-implantares (Persson *et al.*, 2001; Watzek, 2004). O exame radiográfico permite avaliar a altura da crista óssea em relação ao implante, possibilitando acompanhar a evolução da osseointegração. No entanto, esses critérios de avaliação não permitem acompanhar alterações iniciais no sítio peri-implantar, como neoformação óssea ou reabsorção relacionada a peri-implantite (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Yalçın *et al.*, 2005). Uma vez que os processos inflamatórios peri-implantares evoluem de forma mais rápida que os periodontais, o diagnóstico precoce dessas alterações é essencial para o tratamento da doença e manutenção dos implantes (Paolantonio *et al.*, 2000; Yalçın *et al.*, 2005).

2.2.1. Mucosa Peri-implantar

A mucosa peri-implantar é constituída por lâmina própria densa e colagenosa coberta por delgado epitélio oral estratificado e pavimentoso. Essa porção de mucosa que circunda os implantes é análoga à gengival marginal encontrada ao redor da dentição natural. Sendo assim, a mucosa peri-implantar possui importante função de proteção atuando como barreira biológica, promovendo vedamento entre meio externo e meio interno, garantindo a integridade dos tecidos e, conseqüentemente a longevidade dos implantes (Koka, 1998; Weber & Cochran 1998).

Semelhante ao periodonto de proteção, o epitélio da mucosa peri-implantar apresenta uma face voltada para a cavidade oral (externa) e outra

que constitui a junção implante-epitélio. A porção externa é revestida por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que se continua com o epitélio não-queratinizado que reveste o assoalho do sulco peri-implantar. Na face voltada para o implante, a mucosa está aderida à superfície do implante por uma porção de epitélio semelhante ao epitélio juncional, denominada junção implante-epitélio. Essa adesão das células epiteliais ao implante é feita por hemidesmossomos e lâmina basal (Bernard *et al.*, 1997; Koka, 1998; Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999).

As principais diferenças entre a mucosa peri-implantar e a gengiva marginal residem na composição do conjuntivo, no alinhamento dos feixes de fibras colágenas e na vascularização (Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999). Quando comparada com a gengiva marginal, a lâmina própria da mucosa peri-implantar apresenta algumas diferenças quanto à proporção de colágeno e fibroblastos. Na região peri-implantar o tecido conjuntivo apresenta característica de tecido cicatricial, sendo constituído por poucas células e muitas fibras colágenas (Bernard *et al.*, 1997; Jovanovic, 1997; Koka, 1998; Lindhe & Berglundh, 1999; Groisman & Vidigal Jr, 2004).

Devido à ausência do cimento e a influência das características da superfície dos implantes, os feixes de fibras colágenas da região supra-alveolar, organizam-se diferentemente do ligamento gengival do periodonto de proteção. Na mucosa peri-implantar, por não terem onde inserir, não há feixes de fibras perpendiculares ao implante, sendo grande parte das fibras dispostas paralelas ao longo eixo dos implantes. Diante disso, a adesão entre a mucosa peri-implantar e a superfície do implante é mais frágil que a entre dente e gengiva (Bernard *et al.*, 1997; Koka, 1998; Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999; Machtei *et al.*, 2006).

Outra diferença existente entre os tecidos moles que circundam dentes e implantes reside no suprimento vascular sanguíneo. Nos tecidos periodontais a vascularização provem de duas origens, uma a partir de vaso supraparietal, que forma os capilares das papilas do conjuntivo subjacente ao epitélio oral e ao plexo vascular lateral ao epitélio juncional. A outra origem é derivada do plexo vascular do ligamento periodontal, que emite ramificações

em direção coronária, passando pela crista alveolar e terminando na porção supra-alveolar da gengiva livre. Já na mucosa peri-implantar a vascularização é garantida apenas pelo vaso sanguíneo suprapariosteal localizado externamente ao processo alveolar, que origina o plexo de capilares e vênulas localizado subjacente ao epitélio juncional e ao epitélio oral. Devido à ausência do plexo proveniente do ligamento periodontal, na mucosa peri-implantar, o conjuntivo supra-alveolar apical ao epitélio juncional apresenta-se pouco vascularizado (Jovanovic, 1997; Koka, 1998; Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999)

2.3. Doença Periodontal e Peri-implantar

A doença periodontal é uma patologia infecciosa associada à presença de bactérias gram-negativas, anaeróbias, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacterioides forsythus* e *Actinobacillus actinomycetecomitans*, presentes no biofilme dental. Entretanto, o fato de um indivíduo estar colonizado por essas bactérias não significa que desenvolverá doença periodontal (Höfling & Gonçalves, 2006).

Segundo o conhecimento atual, a doença periodontal é de natureza etiológica multifatorial, ou seja, é provocada por diversos fatores que agem de maneira conjunta e simultânea. Dentro deste conceito, o hospedeiro passou a ser considerado como componente fundamental, incluindo suas características individuais e os mecanismos da resposta imunológica. Assim, além dos fatores causais, como a presença da placa bacteriana, existem também fatores de risco que influenciam diretamente no estabelecimento da doença periodontal. Além disso, a maior parte do dano tecidual ocasionado pelas bactérias e seus subprodutos, que resulta na degradação do ligamento periodontal e perda óssea irreversível, depende da resposta do hospedeiro (Papapanou & Lindhe, 1999; Goutoudi *et al.*, 2004; Höfling & Gonçalves, 2006).

Mesmo em gengivas clinicamente saudáveis, existe um infiltrado inflamatório constante com células inflamatórias como linfócitos, neutrófilos e macrófagos, que parecem ser essenciais à manutenção da homeostase entre

tecidos periodontais e bactérias presentes na placa ou biofilme dental (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Berglundh & Donati, 2005; Ferraris & Muñoz, 2006; Honda *et al.*, 2006).

A gengivite é caracterizada pelo estabelecimento e aumento da inflamação, ainda circunscrita aos tecidos moles, mais especificamente à gengiva marginal. Este processo pode ou não evoluir para periodontite (Berglundh & Donati, 2005; Honda *et al.*, 2006). A partir do momento em que ocorre a progressão da doença, levando a um comprometimento das estruturas de suporte, tem se instalado o quadro de periodontite. Neste estágio mais avançado, pode ocorrer a formação de bolsas periodontais, devido à migração do epitélio juncional em sentido apical, até atingir fibras do ligamento periodontal que ainda não foram destruídas (Katchburian & Arana, 2004).

As reações inflamatórias e imunológicas à placa bacteriana representam características predominantes tanto na gengivite quanto na periodontite (Kinane & Lindhe, 1999). As interações hospedeiro-bactérias irão determinar a extensão da doença. Assim, os microorganismos patogênicos podem influenciar no curso da doença por produzirem substâncias tóxicas aos tecidos, por invadirem diretamente estes tecidos e por estimularem a resposta do hospedeiro. Em geral, a invasão bacteriana e a liberação de suas toxinas são nocivas ao hospedeiro, no entanto, a resposta a essa agressão pode apresentar caráter protetor ou destrutivo (Newman *et al.*, 1997; Goutoudi *et al.*, 2004).

Além da destruição dos tecidos promovida diretamente pelos mecanismos patogênicos das bactérias, estes ainda induzem as células hospedeiras a liberarem mediadores biológicos que também promovem destruição tecidual. Entre estes mediadores produzidos como respostas do hospedeiro estão: proteinases, citocinas e prostaglandinas (Goutoudi *et al.*, 2004; Ozmeric 2004; Liskmann *et al.*, 2006).

Evidências recentes indicam que nas periodontites, produtos bacterianos (tais como lipopolissacarídeos e endotoxinas), induzem uma resposta inflamatória em que muitas citocinas inflamatórias liberadas pelas células hospedeiras são responsáveis pelo processo de destruição do

periodonto (Goutoudi *et al.*, 2004; Martelli *et al.*, 2004; Ozmeric 2004; Liskmann *et al.*, 2006). Estas substâncias, em geral são classificadas como citocinas inflamatórias a IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, PGE2 e TNF- α (Martelli *et al.*, 2004; Liskmann *et al.*, 2006). Algumas dessas citocinas são produzidas por células imunocompetentes presentes nas proximidades do sítio inflamado, como células T e monócitos; ou por células que normalmente compõe o tecido periodontal, como fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais (Liskmann *et al.*, 2006). Muitos desses mediadores inflamatórios relacionados com a destruição periodontal foram identificados no fluido crevicular gengival (Goutoudi *et al.*, 2004).

Estudos em animais e em humanos têm demonstrado semelhanças clínicas, radiográficas e histológicas entre a infecção periodontal e peri-implantar (Liskmann *et al.*, 2006). O mesmo mecanismo patogênico responsável pela instalação da doença periodontal parece existir nos tecidos peri-implantares, ainda com o agravante de evoluir de forma mais rápida e agressiva que no dente (Jovanovic, 1997; Persson *et al.*, 2001; Martelli *et al.*, 2004).

O sulco peri-implantar, que é semelhante ao sulco gengival quanto à anatomia, função e no microambiente, atua como nicho propício para colonização e crescimento de microorganismos orais (Liskmann *et al.*, 2006). Assim, o acúmulo de placa na superfície dos implantes e no sulco peri-implantar, inicialmente leva à um comprometimento do epitélio e à aumento no infiltrado inflamatório do conjuntivo (Jovanovic, 1997).

O quadro de mucosite peri-implantar caracteriza-se por um processo inflamatório inicial e reversível, restrito aos tecidos moles que circundam o implante. No entanto, persistindo o agente agressor, esse processo pode evoluir rapidamente para uma inflamação severa e irreversível, denominada peri-implantite. Este estágio avançado da doença é caracterizado pela destruição do osso de suporte e dos tecidos moles adjacentes, levando conseqüentemente ao comprometimento do implante devido à perda de ancoragem (Weber & Cochran 1998; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Kivela-

Rajamaki *et al.*, 2003b; Martelli *et al.*, 2004; Yalçın *et al.*, 2005; Liskmann *et al.*, 2006).

Um dos critérios utilizados para avaliação clínica dos tecidos periodontais é a profundidade de sondagem. No entanto, nos tecidos peri-implantares, este parâmetro torna-se menos confiável, devido à disposição das fibras colágenas paralela à superfície do implante (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b). O exame radiográfico, que também é utilizado para determinar a condição de saúde dos implantes, só permite avaliar a perda óssea quando essa está avançada, e praticamente irreversível (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a). Essas limitações dos exames disponíveis dificultam o estabelecimento da condição clínica dos implantes e têm estimulado a busca por marcadores biológicos que possam ser utilizados como métodos de diagnóstico precoce da saúde peri-implantar (Liskmann *et al.*, 2004).

Devido à rapidez na evolução dos processos inflamatórios peri-implantares, o monitoramento dos implantes dentais é crítico para prevenção ou detecção precoce da inflamação e possível destruição óssea, sendo essencial no tratamento da doença e na manutenção dos implantes (Paolantio *et al.*, 2000; Yalçın *et al.*, 2005). Assim, têm se buscado métodos de diagnóstico complementar, que permitam detectar alterações iniciais no sítio peri-implantar em estágios ainda não detectáveis em exames clínicos e radiográficos (Liskmann *et al.*, 2004). Métodos dessa natureza vêm sendo bastante estudados na doença periodontal com objetivo de identificar marcadores biológicos presentes no fluido crevicular (Murata *et al.*, 2002; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Yalçın *et al.*, 2005; Gurkan *et al.*, 2006).

A semelhança entre o microambiente periodontal e peri-implantar (Yalçın *et al.*, 2005) torna viável à implantodontia os diagnósticos complementares que vêm sendo estudados na periodontia. Alguns desses estudos verificaram modificações na composição da saliva (Kaufman & Lamster, 2000; Ozmeric 2004; Gomes *et al.*, 2006; Liskmann *et al.*, 2006) e do fluido crevicular (Ozmeric 2004, Griffiths, 2003; Loos & Tjoa, 2005; Tozum *et al.*, 2005) em indivíduos com periodontite e peri-implantite, confirmando a utilização desses fluidos como ferramenta de diagnóstico.

2.4. Defesa da Cavidade Oral

A cavidade oral possui uma complexa flora microbiana, composta por microorganismos permanentes e transitórios. Além disso, há uma variedade de nichos, tais como: a superfície dental, a língua e o sulco gengival, que favorecem o estabelecimento e o desenvolvimento dessa microbiota. Muitos desses microorganismos estabelecem uma relação de simbiose com o hospedeiro, entretanto, algumas espécies são patogênicas. Assim, o meio bucal representa uma porta de entrada para diversos patógenos envolvidos direta ou indiretamente em doenças infecciosas locais e/ou sistêmicas (Ebersole 2003).

Entre as diversas funções que a mucosa oral desempenha, a principal delas é a de proteção. Diante desse desafio antigênico, o próprio revestimento epitelial da mucosa, representa uma barreira natural, protegendo os tecidos mais profundos do ambiente contaminado que é a cavidade oral (Ten Cate; 2001; Ebersole 2003). Para manter a homeostasia do meio, existem vários mecanismos do sistema imune que contribuem para controlar a colonização microbiana e dentre eles estão o fluido sulcular e a saliva, que servem como fatores mecânicos, minimizando a acumulação bacteriana.

2.4.1. Fluido sulcular gengival e peri-implantar

O fluido crevicular do sulco gengival foi identificado no século XIX, mas somente a partir da década de 50, é que sua composição e possível papel nos mecanismos de defesa da cavidade oral começaram a ser elucidados (Carranza & Bulkacz, 1997).

Localizado banhando a região dos sulcos gengival e peri-implantar, o fluido sulcular é formado graças à permeabilidade do epitélio juncional que permite a passagem de vários componentes macromoleculares derivados do soro e do meio intersticial da gengiva. Assim, este fluido é constituído por um ultra-filtrado do plasma sanguíneo, contendo enzimas e proteínas individuais, tais como: proteases inibidoras, microglobulinas β_2 ,

fibrinogênio, albumina, lipoproteínas, bem como mediadores pró inflamatórios, fatores de crescimento, como TGF- β e imunoglobulinas G e A (IgG e IgA). Além destes componentes, o fluido contém células descamadas dos epitélios juncional e sulcular, bem como células de defesa (neutrófilos, linfócitos e monócitos) que migram constantemente do conjuntivo para o sulco. No fluido podem ser encontrados também bactérias e acúmulos de elementos do metabolismo de bactérias (Carranza & Bulkacz, 1997; Ten Cate, 2001; Ebersole 2003; Goodson 2003, Ozmeric 2004).

Devido à sua consistência fluida e fluxo constante, o fluido sulcular age como fator de limpeza mecânica, minimizando o acúmulo de bactérias. As moléculas da imunidade inata e adquirida presentes no fluido também contribuem para a homeostasia do meio. (Ten Cate; 2001; Ebersole 2003). Com base nessas características, o fluido gengival vem sendo estudado como método de diagnóstico para determinar o estado de atividade da doença periodontal ou risco do indivíduo a doença (Carranza & Bulkacz, 1997; Goodson, 2003; Ozmeric, 2004).

No periodonto saudável, alguns constituintes do fluido, como as imunoglobulinas IgG e IgA, e enzimas como a collagenase II, apresentam-se em níveis baixos, atuando de forma protetora (Ebersole, 2003). Já no periodonto inflamado, ocorre aumento do fluido crevicular e mudanças na composição desse exsudato, que passa a apresentar mais componentes vasculares e celulares pró-inflamatórios (Ebersole, 20003; Loos e Tjoa, 2005).

Vários estudos têm evidenciado a importância do fluido crevicular nos mecanismos de defesa do periodonto (Loos e Tjoa, 2005), mas, somente na última década, pesquisadores passaram a propor métodos de análise que permitissem sua utilização no diagnóstico da doença periodontal (Goodson, 2003).

Para análise do fluido foi desenvolvida metodologia para coleta com pontas de papel absorvente e mensuração do volume de fluido através do aparelho Periotron® (Goodson, 2003; Perinetti & Spoto, 2004). Além de medir variações no volume de fluido gengival em função do estado de saúde do periodonto, essas pesquisas procuraram avaliar macromoléculas presentes no

fluido que aumentassem sua concentração progressivamente em função do estágio de evolução da periodontopatia (Griffiths, 2003).

A maioria dos trabalhos correlaciona a presença da doença periodontal a um aumento no volume do fluido crevicular, o que poderia sinalizar o grau de inflamação, ainda em estágio subclínico. Assim, o volume e a consistência do fluido funcionariam como indicadores mais precisos do que medidas clínicas, como aspecto colorimétrico e os índices gengival e de sangramento. Dessa forma, mesmo em gengivas clinicamente saudáveis, o aumento na quantidade do fluido crevicular e a propensão ao sangramento, funcionaria como método de diagnóstico precoce de inflamação (Griffiths, 2003).

Segundo Loos e Tjoa (2005) existem aproximadamente 100 componentes do fluido crevicular que podem ser utilizados como marcadores no diagnóstico precoce da periodontite. Muitos desses marcadores podem ser utilizados como marcadores de saúde periodontal, e futuramente poderão ser utilizados no monitoramento de indivíduos com periodonto saudável. Estes testes são simples e de baixo custo, possibilitando diagnosticar alterações moleculares que caracterizem um desequilíbrio local, antes mesmo da doença periodontal instalar-se.

As similaridades entre o microambiente dos sítios periodontal e peri-implantar, quanto a constituição, a microbiota e à presença de fluido protetor, (Paolantonio *et al.*, 2000) levaram os pesquisadores a investigarem na mucosa peri-implantar os mesmo marcadores biológicos utilizados no diagnóstico das periodontites (Paolantonio *et al.*, 2000; Liskmann *et al.*, 2004, 2006; Yalçın *et al.*, 2005). Esse tipo de análise, pode tornar-se um método de investigação alternativa para acompanhamento longitudinal da saúde peri-implantar nos diferentes tipos de implantes (Yalçın *et al.*, 2005). O fluido peri-implantar possui uma gama de citocinas, enzimas e fatores de crescimento que podem ser mensurados, permitindo avaliar a saúde peri-implantar (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Yalçın *et al.*, 2005).

A presença de marcadores do metabolismo ósseo no fluido peri-implantar pode auxiliar no diagnóstico de perdas ósseas em estágios iniciais,

ainda não visíveis radiograficamente. A mensuração dos níveis de osteocalcina, por exemplo, pode contribuir no monitoramento do *turnover* ósseo no sítio peri-implantar (Murata *et al.*, 2002). Segundo Murata *et al.* (2002) e Wilson *et al.* (2003), no fluido crevicular também podem ser detectados outros marcadores do *turnover* ósseo, embora não possam ser feitas conclusões sobre sua utilização como métodos de diagnóstico.

A IL-1 β é um dos vários mediadores da inflamação que foram identificados no fluido crevicular (Nicolau *et al.*, 2003; Konradsson & Van Dijken, 2005). Esta citocina é produzida principalmente pelos monócitos e macrófagos, mas também pode ser sintetizada por fibroblastos e células ósseas. Entre os efeitos biológicos da IL-1 β podem ser incluídos sua capacidade de estimular linfócitos T, proliferação de linfócitos B, estímulo da produção de PGE2 pelos monócitos e fibroblastos, e liberação de metaloproteinases que degradam as proteínas da matriz. Além disso, a IL-1 β também promove o recrutamento de osteoclastos e a reabsorção óssea, afetando também a quimiotaxia para neutrófilos e a ativação dessas células (Gruica *et al.*, 2004).

Uma série de outras citocinas inflamatórias como a IL-6, IL-8 e TNF- α também tem sido foco de investigações relacionadas à patologias periodontais e peri-implantares. Yalçın *et al.* (2005) observaram correlação positiva entre os níveis de PGE2 e os parâmetros clínicos em pacientes com mucosite. A IL-17 também é apontada como uma das citocinas chave na patologia do periodonto, embora seu papel ainda não esteja completamente esclarecido (Vernal *et al.*, 2005). Outro importante mediador pró-inflamatório encontrado no fluido sulcular é o NO (óxido nítrico). Esta molécula é produzida por diversas células, inclusive células fagocitárias. Segundo Tozum *et al.* (2005, 2007, 2008), a presença do NO no sítio peri-implantar aumenta proporcionalmente ao grau da inflamação, confirmando assim a importância desse mediador frente aos processos inflamatórios da região peri-implantar.

Além dos mediadores pró inflamatórios, também são produzidas citocinas imunoregulatórias como a IL-10. Esta citocina é capaz de ativar a produção de IL1-ra, um antagonista da IL-1, além de poder limitar a duração e

extensão da resposta inflamatória (Konradsson & Van Dijken, 2005). Goutoudi *et al.* (2004) avaliaram o efeito da terapia periodontal nos níveis de IL-10 e IL-1 β no fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica, não encontrando resultados significativos. Entretanto, os autores observaram relação inversa entre os níveis dessas citocinas e o estado de saúde periodontal do indivíduo, com níveis mais altos IL-10 nos sítios periodontais saudáveis.

TGF- β é uma citocina multifuncional, com papel tanto pró como anti-inflamatório, o que a torna uma proteína interessante no monitoramento das patologias peri-implantares e periodontais. Gürkan *et al.* (2006) observaram um aumento dos níveis de TGF- β 1 no fluido crevicular de indivíduos com periodontite quando comparados aos indivíduos com gengivite, atribuindo a esta citocina um papel modulatório importante na doença periodontal, podendo exacerbar quadros inflamatórios.

Outros compostos importantes nos processos inflamatórios, os quais têm sido associados às periodontites e peri-implantites, são as metaloproteinases (MMP). Essas enzimas presentes no fluido periodontal e peri-implantar originam-se dos grânulos azurófilos dos leucócitos polimorfonucleares, no entanto, pesquisas recentes têm demonstrado a produção desses compostos por outros tipos celulares (Liskmann *et al.*, 2004). As MMPs são proteínas zinco específicas que coletivamente degradam quase todos os componentes da matriz extracelular e membrana basal. Além disso, elas podem atuar como sinalizadoras para outras moléculas de defesa ou inflamatórias. Entre as MMPs, a MMP-8 é considerada a mais agressiva aos tecidos periodontais, apresentando níveis elevados nas peri-implantites (Kivela-Kajmaki *et al.*, 2003a; Kivela-Kajmaki *et al.*, 2003b).

A MMP-7 é uma metaloproteína expressa em tecidos não inflamados e na mucosa oral, caracterizando-se por ativar outras metaloproteinases e processar várias moléculas da matriz extracelular, sendo capaz de converter compostos inertes em antimicrobianos ativos. Recentemente, esta metaloproteinase foi identificada no fluido crevicular de indivíduos com periodontopatias, embora não seja conhecido seu mecanismo de atuação (Kivelä-Rajamäki *et al.*, 2003a).

A dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no fluido peri-implantar tem uso potencial na clínica odontológica e também em pesquisas. Esse método pode auxiliar os parâmetros clínicos e radiográficos, já utilizados no acompanhamento longitudinal de implantes, além de auxiliar pesquisas clínicas que buscam comparar neoformação óssea e sucesso de diferentes tipos de implante comercialmente disponíveis.

2.4.2. Saliva

A saliva é um líquido complexo, de consistência viscosa, produzido pelas glândulas salivares, cuja finalidade é a manutenção da umidade na cavidade oral. Na espécie humana encontramos três pares de glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais, localizadas fora da cavidade oral, encapsuladas e com um extenso sistema de ductos por onde descarregam suas secreções. Além dessas glândulas, no interior das membranas mucosas existe ainda grande número de glândulas salivares menores: labiais, linguais, palatinas, bucais, glossopalatinas e retromolares (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A saliva é composta por 99% de água, além de eletrólitos, aminoácidos, enzimas, fatores de crescimento, imunoglobulinas e citocinas, secretadas pelas células do epitélio oral ou originadas do fluido gengival, juntamente com células de defesa (leucócitos). Estão presentes ainda células descamadas do epitélio bucal, bem como microorganismos e seus produtos (Katchburian & Arana, 2004; Walker, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Dentre os componentes protéicos e glicoprotéicos presentes na saliva estão a amilase salivar ou ptialina, mucinas, lisozimas, IgAs, proteínas ácidas ricas em prolina, cistatinas, histatinas, estaterinas, e em menor quantidade: eritropoietina, catalases, peroxidase e lactoperoxidase, anidrase carbônica secretora, IgM e IgG, tromboplastina, ribonuclease, desoxirribonuclease, calicreína, fosfatase ácida, esterase, fator de crescimento nervoso (NGF), epidérmico (EGF), entre outros. Já os componentes orgânicos não-protéicos encontrados são: uréia, ácido úrico, colesterol, AMP cíclico,

glicose, citrato, lactato, amoníaco, creatina, dentre outros. Entre os componentes inorgânicos encontrados na saliva estão: os íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , cloretos, fluoretos, tiocianatos, fosfatos, bicarbonatos e outros (Ferraris & Muñoz, 2006). Esses componentes salivares parecem agir de forma sinérgica na proteção e defesa contra a doença periodontal, embora fatores locais (placa bacteriana) e sistêmicos possam influenciar na progressão das periodontites (Ozmeric, 2004).

Dentre as funções básicas da saliva estão as de proteção, digestão, gustação e ação antimicrobiana, bem como funções reguladoras, como contribuir para a manutenção de um equilíbrio hídrico e da integridade dos dentes, através dos íons cálcio e fosfato que atuam na maturação e remineralização do esmalte. A saliva também possui capacidade de tamponamento, atribuída ao bicarbonato e aos íons fosfato, que neutralizam a acidez da saliva e mantêm um pH inadequado para a colonização de microorganismos (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

A saliva possui um importante papel na digestão por fornecer sensibilidade gustativa, neutralizar o conteúdo do esôfago, diluir o suco gástrico e contribuir na formação do bolo alimentar. Além disso, a amilase salivar ou ptialina, enzima mais abundante na saliva é responsável pela quebra do amido (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

Acredita-se ainda que a saliva esteja envolvida na reparação tecidual da mucosa oral, embora ainda não estejam bem estabelecidos os mecanismos e os efeitos da saliva nesse processo. A presença de lisozima e Ca^{2+} ativam a coagulação, diminuindo o tempo de hemorragia e a ação dos fatores de crescimento nervoso e epidérmico, presentes na saliva, facilitam a rápida cicatrização das feridas bucais (Ten Cate, 2001; Katchburian & Arana, 2004; Ferraris & Muñoz, 2006).

De todas essas funções, a mais relevante é o papel protetor que a saliva exerce na cavidade oral, estando relacionado à imunidade da mucosa, dentes e seus tecidos de sustentação (Walker, 2004). A função protetora da saliva é expressa de várias maneiras. Uma delas é promovendo a lubrificação,

mantendo assim a integridade da mucosa oral. Esse efeito deve-se ao conteúdo glicoprotéico da saliva, destacando-se as mucinas salivares. Essas glicoproteínas concentram-se sobre a superfície da mucosa, formando uma película e promovendo assim uma barreira efetiva contra o ressecamento e estímulos nocivos, limitando a permeabilidade da mucosa oral, dificultando a penetração de substâncias irritantes ou toxinas, além de pequenos traumas e agressões produzidas por agentes irritantes (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006).

Devido à sua consistência fluida, a saliva é capaz de promover uma ação de lavagem mecânica. O fluxo salivar lava e arrasta células descamadas, restos alimentares e microorganismos como: bactérias, fungos e vírus; diluindo os produtos de seus metabolismos (toxinas, ácidos) e interferindo na sua aderência. Além disso, a saliva propicia uma ação limpadora quando associada ao movimento dos lábios e língua (Ten Cate, 2001; Ferraris & Muñoz, 2006)

Somente nas últimas três décadas os pesquisadores iniciaram pesquisas buscando identificar quais os fatores protetores presentes na saliva e como um desequilíbrio desses fatores poderia predispor os indivíduos a periodontopatias (Tenovuo, 2002). Os componentes salivares que participam nos processos de defesa da cavidade oral podem ser divididos em componentes ativos, inespecíficos, constituído principalmente por enzimas, e componentes passivos, os quais fazem parte da resposta imune humoral e celular (Ferraris & Muñoz, 2006).

Óxido nítrico, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, metaloproteinases, fazem parte dos componentes salivares ativos, não possuem memória imunológica, mas, no entanto são muito importantes na manutenção da homeostase da cavidade oral, modulando a colonização e o metabolismo microbiano (Jespersgaard *et al.*, 2002). A lisozima, por exemplo, é uma enzima que age hidrolisando a parede celular de algumas bactérias, enquanto que a lactoferrina liga-se ao ferro livre, privando assim, as bactérias do seu elemento essencial. Várias pesquisas têm procurado correlacionar aumentos nos níveis de enzimas como gelatinases e metaloproteinases com a presença de doença periodontal ativa (Kaufman & Lamster, 2000; Ozmeric, 2004).

Além das diversas funções e propriedades da saliva, este complexo fluido presente em abundância na cavidade oral, representa também um importante meio de diagnóstico para doenças sistêmicas e bucais. Por se tratar de um fluido de fácil obtenção e manipulação, podendo ser coletado de forma natural e não invasiva, a saliva possui importantes marcadores relacionados com a doença periodontal. Entre os marcadores salivares investigados para diagnóstico periodontal e monitoramento da resposta ao tratamento, estão, além das células hospedeiras, proteínas próprias do organismo (tais como: enzimas e imunoglobulinas), marcadores fenotípicos, hormônios, íons, componentes voláteis, bem como bactérias e suas toxinas (Ozmeric 2004; Liskmann *et al.*, 2006).

Sculley e Langley-Evans (2003) observaram redução na capacidade antioxidante da saliva em indivíduos portadores de condições periodontais desfavoráveis. Alguns componentes antioxidantes da saliva fazem parte do sistema de defesa não específico e, segundo os autores, poderão ser utilizados no monitoramento da doença periodontal.

A principal imunoglobulina presente na saliva é a IgA secretória, que faz parte da resposta imune humoral e específica, sendo capaz de aglutinar microrganismos. Outras imunoglobulinas como IgG e IgM também encontradas na saliva, juntamente com componentes do sistema complemento e imunoglobulinas séricas são derivadas do fluido sulcular (Cole *et al.*, 1981; Kaufman & Lamster, 2000; Ten Cate, 2001; Walker, 2004). Portanto, a análise do isotipo IgG na saliva possivelmente sirva de indicador da doença periodontal. A presença de algumas imunoglobulinas específicas no plasma sanguíneo geralmente está associada à proteção do hospedeiro ou como um possível indicador de uma infecção (Kaufman & Lamster, 2000).

As IgAs secretória e sérica, exercem função protetora e anti-inflamatória, inibindo os mecanismos pró-inflamatórios IgG e IgM-mediados (Hägewald *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram correlação positiva entre o aumento nos níveis de IgA salivar e a severidade da inflamação periodontal (Kaufman & Lamster, 2000; Gomes *et al.*, 2006), embora outros trabalhos tenham demonstrado diminuição dos níveis de IgA1 salivar em

pacientes com doença periodontal severa (Hägewald *et al.*, 2002; Hägewald *et al.*, 2003). Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de algumas bactérias relacionadas à doença periodontal severa como *P. gingivalis*, utilizarem proteases capazes de degradar IgA1 como mecanismo de escape à resposta imune, diminuindo os níveis dessa imunoglobulina na saliva (Hägewald *et al.*, 2002).

Hägewald *et al.* (2003) avaliaram os níveis de IgA1 salivar após o tratamento periodontal de indivíduos com periodontite agressiva generalizada e não observaram diminuição significativa nos níveis de IgA1 após o tratamento clínico, descartando-a como possível marcadora no prognóstico da doença periodontal. No entanto, poucas pesquisas têm sido realizadas utilizando marcadores imunes salivares relacionados à saúde peri-implantar.

Likmann *et al.* (2006) avaliaram os níveis de IL-6 e IL-10 salivar em indivíduos totalmente edêntulos, reabilitados com implantes. Os autores sugeriram uma relação entre níveis elevados de IL6 salivar e peri-implantite. A presença de citocinas na saliva depende principalmente da ativação de linfócitos Th localizados na mucosa oral e/ou no sítio periodontal (Berglundh *et al.*, 2005). Parece haver um predomínio de citocinas produzidas por células Th2, que são produzidas nesses sítios e passam para a saliva (Hofling e Gonçalves, 2006), podendo ser detectadas através de ELISA (Rhodus *et al.*, 2006) ou RT-PCR (Gomes *et al.*, 2006).

Gomes *et al.* (2006) observaram um aumento da expressão de IFN- γ salivar em indivíduos diabéticos com periodontite severa em relação aos indivíduos com periodontite moderada. Esse é um dos poucos estudos que correlaciona diagnóstico clínico através de citocinas salivares e doença periodontal. Vários autores têm investigado citocinas pró-inflamatórias salivares como auxiliares no diagnóstico de outras doenças com manifestação na cavidade oral (Boras, 2006; Rhodus *et al.*, 2006). Entretanto, até o presente momento, existem poucos estudos relacionado a dosagem e expressão de citocinas na saliva com o monitoramento da saúde peri-implantar.

A análise da saliva constitui um interessante modelo de investigação para marcadores pró e antiinflamatórios, e sua relação com a saúde

periodontal e peri-implantar. Além disso, a saliva possui uma íntima relação com o fluido, uma vez que há uma constante troca entre esses meios, sendo encontrados mediadores correspondentes, relacionados diretamente com a proteção da cavidade oral (Liskmann *et al.*, 2006). Sendo assim, as análises salivares podem complementar as investigações do fluido sulcular com a vantagem de estar disponível em maior quantidade que o fluido.

2.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização, presente em uma gama variada de tecidos e envolvida em muitos processos fisiológicos tais como a neurotransmissão; a resposta imune, atuando na defesa inespecífica do hospedeiro e até mesmo na regulação da pressão sanguínea, promovendo a homeostasia vascular (Bryan & Grisham, 2007; Pacher *et al.*, 2007). O interesse no NO tem aumentado significativamente desde a sua descoberta como um mensageiro biológico em 1987 (Brennan *et al.*, 2003). A capacidade das células de mamífero sintetizarem o radical livre óxido nítrico (NO), estimulou uma série de pesquisas buscando elucidar o papel desta molécula que responde de maneira diferente em condições fisiológicas e patológicas (Bryan & Grisham, 2007; Cauwels, 2007; Pacher *et al.*, 2007; Wiley, 2007).

Atualmente já se sabe que o óxido nítrico é um dos mais potentes componentes antibacteriano, possuindo também um papel como modulador da proliferação bacteriana (Carossa *et al.*, 2001). Esses efeitos do NO como agente bactericida têm sido revistos desde o início de 1980 (Brennan *et al.*, 2003).

O óxido nítrico possui múltiplas funções diretamente relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos da região periodontal (Siqueira Jr & Sabóia Dantas, 2000; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006), sendo um importante componente da imunidade inata presente na saliva e nos fluidos periodontal e peri-implantar, que parece estar relacionado com um mecanismo de defesa

não-específica contra bactérias patogênicas (Brennan *et al.*, 2003; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006).

Na saliva o NO possui ação bactericida, limitando a colonização bacteriana (Brennan *et al.*, 2003). Um dos importantes papéis do NO como mediador citotóxico da resposta imune não-específica, pode resultar tanto em efeitos prejudiciais ou benéficos (Tozum *et al.*, 2005). Portanto, a toxicidade do NO não está restrita aos microorganismos (Gyurko *et al.*, 2005), uma vez que quantidades excessivas de NO podem contribuir para a destruição tecidual (Leitão *et al.*, 2005; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006, Wiley, 2007). O óxido nítrico possui função regulatória na inflamação e níveis altos de NO no fluido crevicular tem sido relacionados à destruição tecidual nos sítios periodontal e peri-implantar (Tozum *et al.*, 2005, Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006; Liskmann *et al.*, 2007; Tozum *et al.*, 2007; Tozum *et al.*, 2008).

O NO é sintetizado por uma complexa família de enzimas, denominada NO sintases (NOS). Essas são algumas das muitas complexas enzimas conhecidas e que requerem muitos fatores e co-fatores para sua atividade (Siqueira Jr & Sabóia Dantas, 2000; Brennan *et al.*, 2003; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006; Cauwels, 2007). Sendo assim, as iNOS, isoformas encontrada em células fagocitárias, são expressas em resposta a um estímulo inflamatório, resultam em uma grande produção de NO por um longo período de tempo. A análise imunohistoquímica de casos de doença periodontal humana, sejam gengivites ou mesmo periodontites crônicas tem mostrado um aumento significativo células iNOS positivas, principalmente polimorfonucleares (Tozum *et al.*, 2005).

Na produção do NO, via NOS (NO sintases), o aminoácido L-arginina é utilizado como substrato. Assim, o NO é sintetizado pelas enzimas NOS, que convertem o L-arginina em L-citrulina. No entanto, existe uma enzima, denominada arginase, que compete com o NOS pelo substrato comum que é o L-arginina, consequentemente, a presença dessa enzima reduz a síntese de NO. É o que ocorre nas periodontites, em que a atividade aumentada da arginase salivar, promove redução na síntese de NO (Brennan *et al.*, 2003; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006).

O óxido nítrico por ser um radical livre diatômico, formado por um átomo de nitrogênio e um de oxigênio, possui uma relativa instabilidade, sendo, portanto, uma molécula de vida-curta no sistema biológico. Na presença do oxigênio molecular, o NO sofre uma rápida e espontânea auto-oxidação, produzida pelo iNOS e resultando em uma variedade de óxidos de nitrogênio (Robbins & Grisham, 1997; Siqueira Jr & Sabóia Dantas, 2000; Brennan *et al.*, 2003; Tozum *et al.*, 2005; Bryan & Grisham, 2007; Pacher *et al.*, 2007; Wiley, 2007).

A reatividade e instabilidade do NO, dificulta sua medição precisa nos fluidos corporais. Diante disso, tem se usado como marcador da inflamação, o nitrito (NO_2^-), que é um metabólito final do NO, produzido a partir da redução do nitrato e sendo, portanto, um produto estável da oxidação do NO. A quantificação desse metabólito em amostras biológicas, além de ser um método fácil e direto de medição, ainda proporciona valiosa informação, pois reflete a produção, a bioviabilidade e o metabolismo do NO *in vivo* (Carossa *et al.*, 2001; Leitão *et al.*, 2005; Gyurko *et al.*, 2005; Tozum *et al.*, 2005, 2007 e 2008; Bryan & Grisham, 2007).

Segundo Tozum *et al.* (2005, 2007, 2008), a inflamação e a sobrecarga mastigatória, provocam um aumento nos níveis de nitrito ao redor de implantes inflamados. Embora já se saiba que o nitrito possui diversos papéis no sistema imune, ainda são necessárias mais investigações para uma melhor compreensão da atuação desse metabólito no microambiente oral (Brennan *et al.*, 2003; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006).

Portanto, quantificações dos níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular peri-implantar, associados aos parâmetros clínicos podem ser úteis no diagnóstico precoce de alterações no sítio peri-implantar e na determinação do prognóstico dos implantes.

3. Proposição

O presente estudo teve como objetivos:

- Determinar o nível total de nitrito na saliva e nos fluidos gengival e peri-implantar em indivíduos parcialmente desdentados reabilitados com implantes osseointegrados.
- Verificar a correlação entre os níveis de nitrito (saliva e fluidos gengival e peri-implantar) e parâmetros clínicos de avaliação periodontal e peri-implantar.

4. Material e Métodos

4.1. População

4.1.1. Seleção dos indivíduos

Participaram deste estudo vinte e quatro indivíduos desdentados parciais, sendo 14 homens e 10 mulheres, com idades entre 25 a 45 anos, selecionados de clínica particular, que nos últimos 10 anos (período entre 1996 a 2006) haviam sido reabilitados com diferentes sistemas de implantes osseointegrados. Os implantes eram do tipo hexágono externo, interno e cone Morse, todos instalados pelo mesmo cirurgião e colocados em função há pelo menos um ano.

Para seleção dos indivíduos, os critérios observados foram: indivíduos saudáveis, sem alteração sistêmica; não fossem fumantes; que nos últimos 3 meses não utilizaram medicamentos como antibióticos, antiinflamatórios, imunossupressores ou qualquer outra medicação que pudesse interferir na secreção salivar e não apresentassem história de terapia periodontal ou peri-implantar durante esse período.

Todos os procedimentos foram previamente autorizados pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer nº. 370/06). Os indivíduos foram orientados sobre os procedimentos e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido autorizando a realização dos mesmos.

4.2. Procedimentos clínicos e radiográficos

Inicialmente foram coletados dados referentes à identificação, tais como idade e gênero. Foi realizada anamnese sobre a condição sistêmica atual dos indivíduos e sobre os motivos que levaram à perda do elemento dentário. Em seguida, nova ficha foi preenchida para avaliar o aspecto colorimétrico da gengiva marginal e inserida, presença ou não de edema local e sangramento

espontâneo nos dentes e implantes. Também foram registradas as condições de higiene oral do indivíduo e presença ou não de placa visível (PV) nos implantes.

Após o preenchimento desses dados, em cada indivíduo, foram selecionados um implante e um dente próximo, que não apresentasse doença periodontal, para controle intrínseco. Antes da coleta de saliva e fluido sulcular, o mesmo profissional realizava a higienização local, com escova de dentes nova. Após essas coletas, foram medidas as profundidades dos sulcos gengival e peri-implantar, verificando a presença ou não de sangramento, e em seguida foram obtidas tomadas radiográficas.

Com base nos parâmetros clínicos avaliados nos implantes, os indivíduos foram separados em dois grupos: saudável (mucosa periimplantar íntegra) e doente (mucosa periimplantar com mucosite).

4.2.1 Obtenção das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas de forma não estimulada. Os indivíduos eram instruídos a permitir que a saliva se acumulasse na parte inferior da boca e então depositassem um volume de aproximadamente 5mL em recipiente plástico de coleta, não reutilizável, que foi mantido em gelo até o processamento. Em seguida, as células e os sedimentos foram separados da parte solúvel por duas centrifugações em velocidade 10.000G por 300 segundos. O sobrenadante foi coletado, distribuído em alíquotas de 1mL e congelado a -20°C para posterior dosagem de NO.

4.2.2 Coleta do fluido sulcular

Em cada indivíduo foram coletadas amostras de fluido sulcular nos sítios periodontal e peri-implantar. Previamente à coleta, foi realizada remoção de placa supragengival, sem tocar na gengiva marginal e, o dente e o implante a serem avaliados, eram isolados com roletes de algodão e secada a saliva na superfície da coroa. Em seguida, pontas endodônticas de papel absorvente

padronizadas número 30 - Maillefer, Dentsply, Suíça - (Perinetti & Spoto, 2004) foram introduzidas aproximadamente 1mm no interior do sulco ou até encontrar leve resistência, e deixadas por 30 segundos para absorção do fluido crevicular (Yalçın *et al.*, 2005). As amostras contaminadas com sangue foram descartadas e repetida a coleta.

Em cada implante ou dente foram utilizadas 6 pontas, uma para cada face: disto-vestibular (DV), vestibular central (VC), mesial-vestibular (MV), disto-lingual (DL), lingual central (LC) e mesio-lingual (ML).

Após a coleta, as 6 pontas de papel de cada implante ou dente foram imediatamente colocadas em um tubo plástico de 1.5mL (Eppendorf) com 300µl de solução tampão de armazenagem (50nM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,15M de NaCl e 1mM de CaCl₂) e mantidas em banho de gelo até serem iniciados os procedimentos para extração do fluido absorvido.

Assim, para cada paciente, foram obtidos dois tubos de amostras, um do dente e outro do implante, cada um contendo seis pontas endodônticas com fluidos sulcular (FS) obtidos de cada face (DV, VC, MV, DL, LC, ML).

Para a extração do fluido sulcular absorvido pelas pontas endodônticas, esses tubos (Eppendorf) foram centrifugados duas vezes a uma velocidade 10.000G por 300 segundos. As pontas de papel foram armazenadas para futuros experimentos e o sobrenadante contendo os fluidos foi coletado, distribuído em alíquotas e congelado a -20°C para posteriores dosagens de NO.

4.2.3 Sondagem do sulco gengival

Após a coleta das amostras de saliva e fluidos, foram obtidas as profundidades de sondagem dos sulcos gengival e peri-implantar. Para isso, utilizou-se uma sonda periodontal milimetrada estéril, introduzida ao redor de cada dente e de cada implante obtendo-se 6 medidas: DV, VC, MV, DL, LC, ML (Yalçın *et al.*, 2005). A sonda era introduzida de forma suave, até encontrar ligeira resistência, tendo sempre o cuidado para não causar dano à região. Esse procedimento foi realizado por um único operador.

As medidas obtidas com a sondagem foram anotadas e atribuídos-lhes valores de acordo com essa profundidade, sendo I caso essa medida fosse menor ou igual a 3 milímetros ($I \leq 3\text{mm}$), ou II se fosse maior que 3 milímetros ($II > 3\text{ mm}$).

Durante a sondagem foi verificada, em cada uma das faces, se havia sangramento (SS) ou não. Caso houvesse sangramento quando a sonda periodontal passasse ao longo da margem gengival, à essa face era atribuída o índice 1, caso contrário, a ausência de sangramento era identificada pelo índice 0 (zero).

4.2.4 Exame radiográfico

Em todos os indivíduos foram obtidas radiografias periapicais de rotina, uma do dente (controle intrínseco) e outra do implante. Esses exames radiográficos, de caráter complementar, tiveram o intuito de avaliar a presença de perda óssea ou lesões apicais nos dentes e implantes.

4.2.5 Classificação dos sítios periodontais e peri-implantares

Os dentes foram classificados como saudáveis (livres de doença periodontal) considerando os critérios: profundidade de sondagem menor ou igual a 3 milímetros e ausência de perda óssea.

Os sítios peri-implantares foram classificados em dois grupos: saudável ou doente (mucosites peri-implantar), de acordo com os parâmetros clínicos avaliados: presença ou não de placa visível (PV), profundidade de sondagem (PS) e presença de sangramento durante a sondagem (SS);

A presença de placa visível (PV) foi um índice avaliado apenas nos implantes dentais, aos quais eram atribuídos o valor de 1, se apresentassem placa e 0 caso não houve placa durante o exame clínico. Por esse motivo esse critério não interferia na classificação dos implantes.

Assim, os implantes foram considerados clinicamente saudáveis, com região peri-implantar normal, caso apresentassem sondagem até 3

milímetros (I) e ausência de sangramento (0), podendo apresentar ou não presença de placa visível (Tabela 1).

Os implantes foram considerados doentes, caso apresentassem profundidade de sondagem acima de 3 milímetros e presença de sangramento, podendo apresentar ou não índice de placa visível durante a inspeção visual (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação clínica e diagnóstico dos implantes

Parâmetros Analisados	Condições clínicas dos Implantes	
	Saudável	Doente
Profundidade de sondagem	I (≤ 3mm)	II (>3mm)
Sangramento à sondagem	0	1
Presença de placa visível	0 /1	0 /1

4.3. Procedimentos laboratoriais

4.3.1 Dosagem de Nitrito (NO_2^-) pelo método de Griess

A produção de NO foi determinada pela dosagem do total de nitrito (NO_2^-) nas amostras de saliva e de fluido sulcular, utilizando o método de Griess (Grisham *et al.*, 1996). Para o preparo do reagente de Griess foram misturados quantidades iguais (1:1), de sulfanilamida à 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato à 0,1% em ácido fosfórico à 2,5%.

Em uma microplaca de 96 poços foram colocados 100µl de cada amostra. Foi criada uma curva padrão com nitrito de sódio 200µM até a 11ª diluição na base 2. Em seguida, foram adicionados 100µl de reagente de Griess aos poços que continham a curva e as amostras. O controle da reação (branco) foi feito pela adição de 100µl de solução tampão mais 100µl do reagente de Griess. Essa placa foi incubada à temperatura ambiente para permitir o desenvolvimento e a estabilização do cromóforo. A absorbância da reação foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda entre

540 a 570nm. Após a leitura esses dados foram inseridos no programa Microplate Manager® 4.0. A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras de saliva e fluido sulcular em relação à curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2 , $200\mu\text{M} - 0,1\mu\text{M}$). Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em $\mu\text{M NO}_2^-$ e foram analisadas estatisticamente.

4.4 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prisma. Foi realizado um estudo interno (implante versus dente, do mesmo indivíduo) e externo (entre os implantes, de indivíduos diferentes), para determinar os níveis totais de nitrito na saliva e no fluido sulcular (FS) e os diversos parâmetros clínicos, de acordo com as condições de saúde peri-implantar (saudável ou doente).

Para os parâmetros clínicos e níveis de nitrito na saliva e nos fluidos gengival e peri-implantar, foi testada a normalidade da distribuição das amostras. Uma vez que os dados não apresentavam distribuição normal, o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni foi executado para comparações pareadas entre dentes e implantes, sem notificação do estado peri-implantar. Os níveis de nitrito na saliva também não apresentaram distribuição normal, e a correlação entre a saliva e o fluido sulcular peri-implantar foi analisada com coeficiente de correlação de Spearmans.

As comparações entre os parâmetros clínicos e níveis de nitrito, de acordo com o estado do implante também foi testada a normalidade da distribuição. Comparações entre implantes saudáveis e doentes foram feitas usando o teste de Mann-Whitney, enquanto que para as comparações entre os dentes e implantes em cada grupo (saudável ou doente) foi usado o teste Mann-Whitney com correção Bonferroni. A correlação entre níveis de nitrito e parâmetros clínicos registrados foi analisada com teste de correlação de Spearmans. Os valores de p menores do que o 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Dados Clínicos

Segundo os dados obtidos na anamnese, a respeito da história odontológica, a maioria dos indivíduos tinha conhecimento sobre os motivos que levaram à perda do elemento dentário e a colocação dos implantes. Dentre esses motivos 29,2% dos indivíduos relataram insucesso no tratamento endodôntico; 20,9% perda dental devido à traumas ou fratura; 20,9% por cáries dentais; 16,7% eram casos de agenesia dental (ausência do elemento dentário) e 12,5% perda devido à doença periodontal.

Dos vinte e quatro implantes dentais avaliados, nove eram do tipo hexágono externo, dez hexágono interno e cinco cone Morse. Os implantes estavam em função de 1 a 10 anos (média de 7.01 anos), variavam em comprimento de 10 a 15 mm e em diâmetro de 3,3 a 5mm. Dos vinte e quatro dentes selecionados para controle intrínseco nenhum apresentou profundidade de sondagem maior que 3 milímetros. Nove dentes (37,5%) apresentaram sangramento à sondagem em pelo menos uma das faces. Cinco dentes eram tratados endodônticamente (20,83%) e dois apresentavam próteses fixas (8,33%). Considerando o critério de profundidade de sondagem e por não apresentarem perda óssea, todos os dentes foram considerados livres de doença periodontal.

Dentre os vinte e quatro implantes, nove apresentaram tecidos peri-implantares saudáveis. Quinze implantes apresentaram mucosites e nenhuma peri-implantite. A tabela 2 mostra os dados clínicos dos grupos, incluindo PS, SS e PV. Para as variáveis categóricas os resultados foram apresentados como número e porcentagem e para variáveis contínuas os dados foram apresentados como média e desvio padrão (DP).

Nos grupos saudável e doente, quando comparados dente versus implante do mesmo paciente, a média de profundidade de sondagem foi significativamente maior nos sítios dos implantes do que nos sítios dentais ($p<0,05$). Quando comparado a profundidade de sondagem nos implantes dos

diferentes indivíduos, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os implantes do grupo saudável ($2,54 \pm 0,25\text{mm}$) e do grupo doente ($3,30 \pm 0,66$ milímetros), (Tabela 2).

Na comparação entre indivíduos, todos os parâmetros clínicos analisados (PS, SS e PV) apresentaram valores mais baixos nos implantes saudáveis do que nos inflamados, isto é, com mucosite peri-implantar (Tabela 2). Nos dentes avaliados, nove apresentaram sangramento à sondagem (SS), dos quais dois eram dentes controles para os implantes localizados no grupo saudável e os outros sete eram dentes controle para os implantes do grupo doente. Dos quinze implantes do grupo doente, treze (86,67%) apresentaram sangramento à sondagem. Já no grupo saudável, nenhum dos implantes mostrou sangramento.

Quando comparados dentes dos dois grupos, a média de sangramento por face de dente, foi maior nos indivíduos do grupo doente ($1,26 \pm 1,58$) do que nos do grupo saudável ($0,22 \pm 0,44$), mas essas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p = 0,47$). Dentro do grupo doente, quando comparados dente versus implante, a média de sítios que apresentaram sangramento, foi semelhante nos implantes ($1,86 \pm 1,25$) e seus respectivos controles intrínsecos ($1,26 \pm 1,580$), não demonstrando qualquer diferença estatisticamente significativa ($p = 0,14$).

A presença de placa visível ou não (PV) foi um parâmetro avaliado apenas nos implantes e, dos vinte e quatro implantes analisados, dez apresentaram placa visível (41,7%), sendo dois no grupo saudável (20,8%) e oito no grupo doente (33,3%). Ao comparar a média de implantes com placa nos grupo saudável ($0,22 \pm 0,44$) e no doente ($0,53 \pm 0,51$) não foi encontrada diferença estatística ($p = 0,21$).

Tabela 2. Parâmetros clínicos nos grupos saudável e doente

Grupos	Profundidade de sondagem (PS)	Sangramento à sondagem (SS)		Presença de placa visível (PV)	
	$\mu^a \pm DP^b$	Sítios por Dente/Implante	%	$\mu^a \pm DP^b$	%
Implantes Grupo Saudável (n=9) ^c	2.54±0.25	0	0	0.22±0.44	20.8
Dentes Grupo Saudável (n=9) ^d	1.73±0.51	0.22±0.44	22.2%	*	*
Implantes Grupo Doente (n=15) ^e	3.30±0.66	1.86±1.25	86.7%	0.53±0.51	33.3%
Dentes Grupo Doente (n=15) ^f	1.88±0.44	1.26±1.58	40.6%	*	*

^aMédia; ^bDesvio padrão. *Este parâmetro não foi analisado nos dentes dos grupos saudável e doente. Os valores expressos em porcentagem são para elementos que mostraram esta característica em relação ao total no grupo. Os seguintes grupos não apresentaram diferença estatística significativa ($p>0.05$) quando analisados para SS ^eversus^f, ^dversus^f; para PV ^cversus^e. Para PS todas as comparações foram significantes ($p<0.05$) ^cversus^d, ^eversus^f, ^cversus^e.

5.2. Níveis totais de nitrito

5.2.1. Nível total de nitrito no fluido sulcular (FS) e na saliva

Em todos os sítios experimentais foi detectada a presença de nitrito. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,25$; Fig. 1A) nos níveis de nitrito no fluido sulcular dos dentes do grupo saudável ($7,99 \mu\text{M} \pm 4,13$) e do grupo doente ($9,48 \mu\text{M} \pm 9,76$). Do mesmo modo, as diferenças entre as médias dos níveis de nitrito no fluido e implantes saudáveis ($8,67 \mu\text{M} \pm 5,30$) e doentes ($9,48 \mu\text{M} \pm 9,76$) não foram significantes ($p=0,31$; Fig. 1B).

Dentro do grupo saudável, a média do nível total de nitrito encontrado no fluido foi maior nos sítios dos implantes ($8,67 \mu\text{M} \pm 5,30$) do que nos dentes correspondentes ($7,99 \mu\text{M} \pm 4,13$), mas não mostrou significância ($p=0,665$; Fig. 1C). Resultado semelhante foi observado dentro do grupo

doente, quando comparado o fluido de implantes inflamados ($9,48 \mu\text{M} \pm 9,76$), com os dentes correspondentes ($6,34 \mu\text{M} \pm 4,52$) ($p=0,663$; Fig.1D).

Ao comparar o nível total de nitrito salivar nos dois grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,72$) entre indivíduos saudáveis ($108,8 \mu\text{M} \pm 92,45$) e doentes ($117,8 \mu\text{M} \pm 87,16$).

5.3. Análises das correlações entre grupos saudável e doente

5.3.1. Correlação entre achados clínicos e nível total de nitrito

Nos dentes do grupo saudável não houve correlação entre a média do nível total de nitrito do fluido sulcular e os parâmetros PS ($p=0,67$; $r = 0,15$, Fig.2A) ou SS ($p=0,21$; $r=- 0,46$, Fig.2B). Resultado semelhante foi observado nos dentes do grupo doente quando comparados o nível total de nitrito e os parâmetros PS ($p=0,09$; $r= 0,45$, Fig. 2C) ou SS ($p=0,9$; $r=0,03$, Fig.2D). Entre os implantes também não houve correlação entre o nível total de nitrito do fluido peri-implantar (FSPI) e os parâmetros clínicos (PS, SS, e PV) nos grupos saudável (para PS, $p=0,29$; $r=-0,38$, Fig. 2E) e doente (para PS, $p=0,77$, $r = -0,08$, Fig. 2F; para SS, $p=0,75$ $r= 0,08$; para PV, $p=0,43$ $r=0,21$), exceto para o índice PV nos implantes saudáveis ($p=0,031$; $r=- 0,72$), (Tabela 3).

O nível total de nitrito na saliva não demonstrou correlação entre parâmetros clínicos (PS e SS) nos dentes do grupo saudável (para PS, $p=0,58$; $r=-0,20$; para SS, $p=0,16$; $r=0,51$, Figs.3A, B) ou do grupo doente (para PS, $p=0,75$; $r=- 0,08$; para SS, $p=0,53$; $r = -0,17$, Figs.3C, D). Da mesma forma, não houve correlação significativa entre o nível total de nitrito na saliva e os parâmetros clínicos nos implantes saudáveis (para PS, $p=0,9$; $r=- 0,05$, Fig. 3E; para PV, $p=0,31$; $r=0,41$) e nos implantes doentes (para PS, $p=0,79$; $r= -0,07$, Fig. 3F; para SS, $p=0,88$; $r=- 0,04$; para PV, $p=0,08$; $r=- 0,46$), (Tabela 3).

5.3.2. Correlação entre os níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular

Não houve correlação entre os níveis de nitrito na saliva e no fluido gengival, tanto no grupo saudável ($p=0,74$, $r=0,13$, Fig. 4A) como no grupo doente ($p=0,51$; $r=0,18$, Fig. 4B). Do mesmo modo, o nível total de nitrito nos sítios dos implantes saudáveis ($p=0,98$; $r=-0,01$, Fig. 4C) ou doentes ($p=0,57$; $r=0,15$, Fig. 4D), não apresentaram correlação com os níveis de nitrito salivares.

Tabela 3. Correlação entre os parâmetros clínicos e os níveis de nitrito

	Parâmetros Clínicos									
	Grupo Saudável					Grupo Doente				
	Dente		Implante			Dente		Implante		
	PS	SS	PS	SS	PV	PS	SS	PS	SS	PV
Nitrito salivar	P=0,58	P=0,16	P=0,9	*	P=0,31	P=0,75	P=0,53	P=0,79	P=0,88	P=0,08
	r=-0,20	r=0,51	r=-0,05		r=0,41	r=-0,08	r=-0,17	r=-0,07	r=-0,04	r=-0,46
Nitrito Fluido sulcular	P=0,67	P=0,21	P=0,29	*	P=0,031	P=0,09	P=0,9	P=0,77	P=0,75	P=0,43
	r=0,15	r=-0,46	r=-0,38		r=-0,72	r=0,45	r=0,03	r=-0,08	r=0,08	r=0,21

* Este critério não se aplica aos implantes saudáveis.

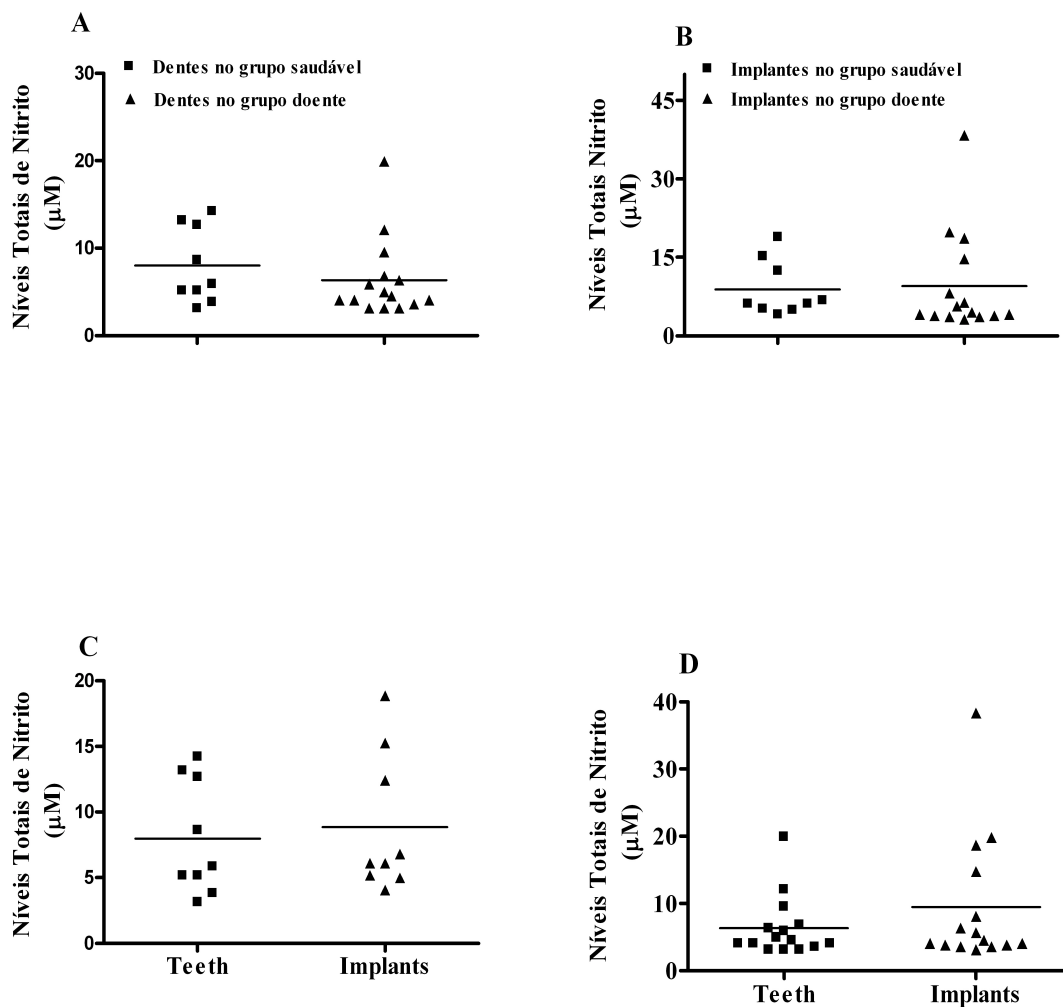


Figura 1. Níveis totais de nitrito nos sítios periodontal e peri-implantar. A – comparação entre os níveis totais de nitrito no fluido sulcular de dentes dos grupos saudável e doente. B - comparação entre os níveis totais de nitrito no fluido sulcular de implantes dos grupos saudável e doente. C, D - comparação entre os níveis totais de nitrito no fluido sulcular de dentes dos grupos saudável (C) e doente (D).

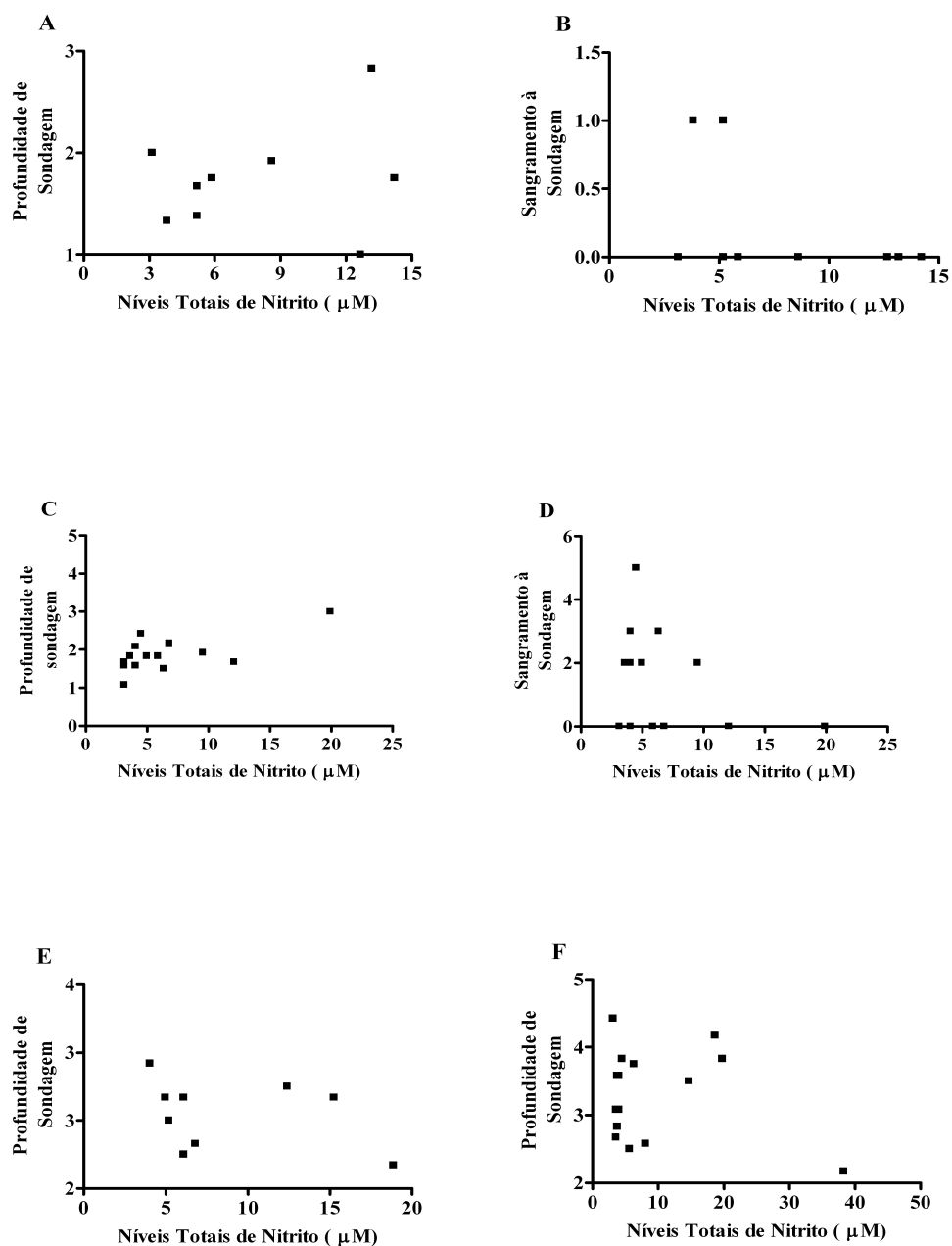


Figura 2. Análises das correlações entre os parâmetros clínicos e os níveis de nitrito no fluido sulcular. A, B - Correlação entre PS (A) ou SS (B) e os níveis de nitrito no fluido sulcular de dentes do grupo saudável. C, D - correlação entre PS (C) ou SS (D) e os níveis de nitrito no fluido sulcular de dentes do grupo doente. E, F - correlação entre PS nos implantes saudáveis (E) ou doentes (F) e os níveis de nitrito no fluido sulcular.

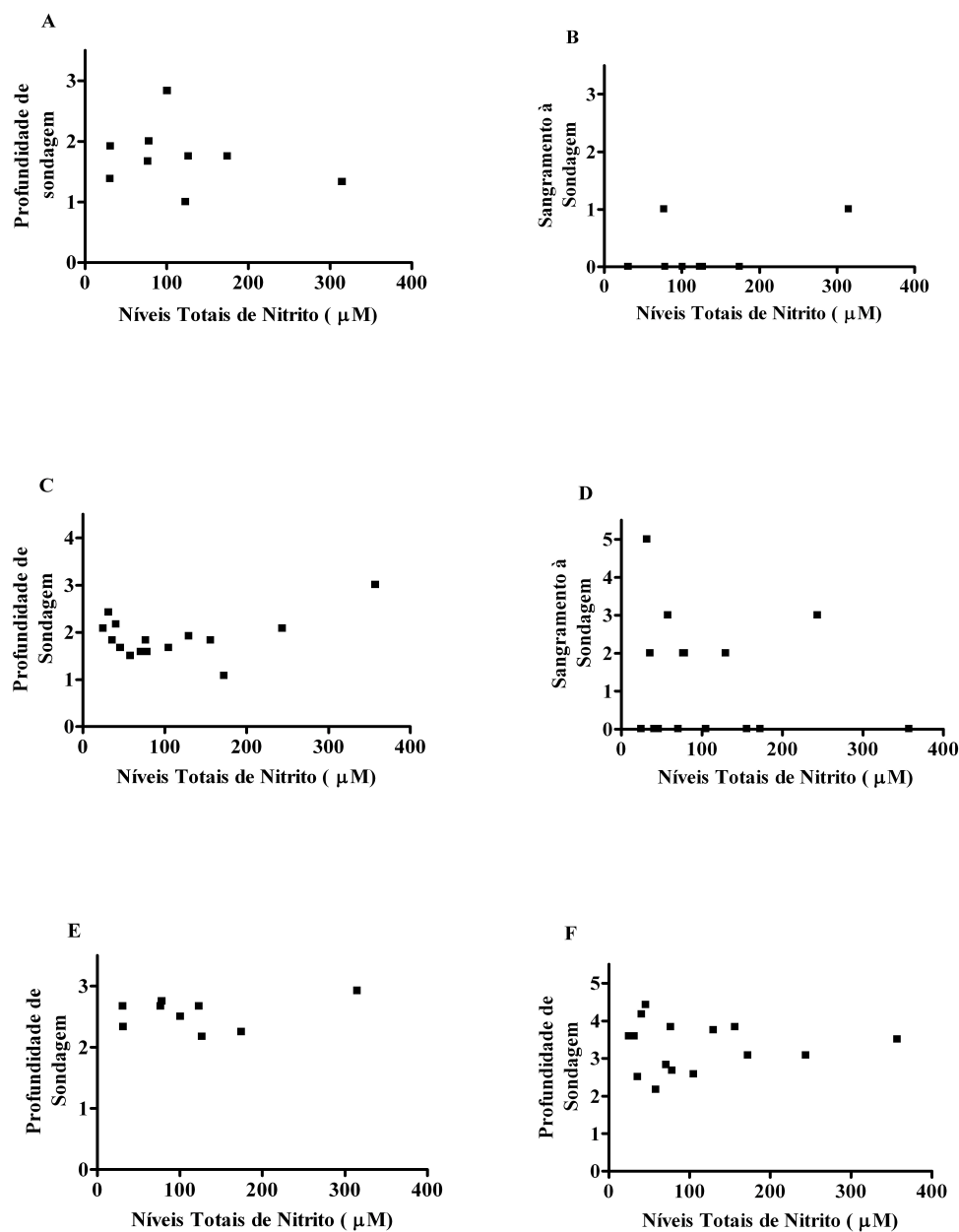


Figura 3. Análises das correlações entre os parâmetros clínicos e os níveis de nitrito salivares. A, B - Correlação entre PS (A) ou SS (B), nos dentes do grupo saudável e níveis de nitrito salivares. C, D - correlação entre PS (C) ou SS (D), nos dentes do grupo doente e níveis de nitrito salivar. E, F - correlação entre PS no implantes saudáveis (E) ou doentes (F) e níveis de nitrito salivares.

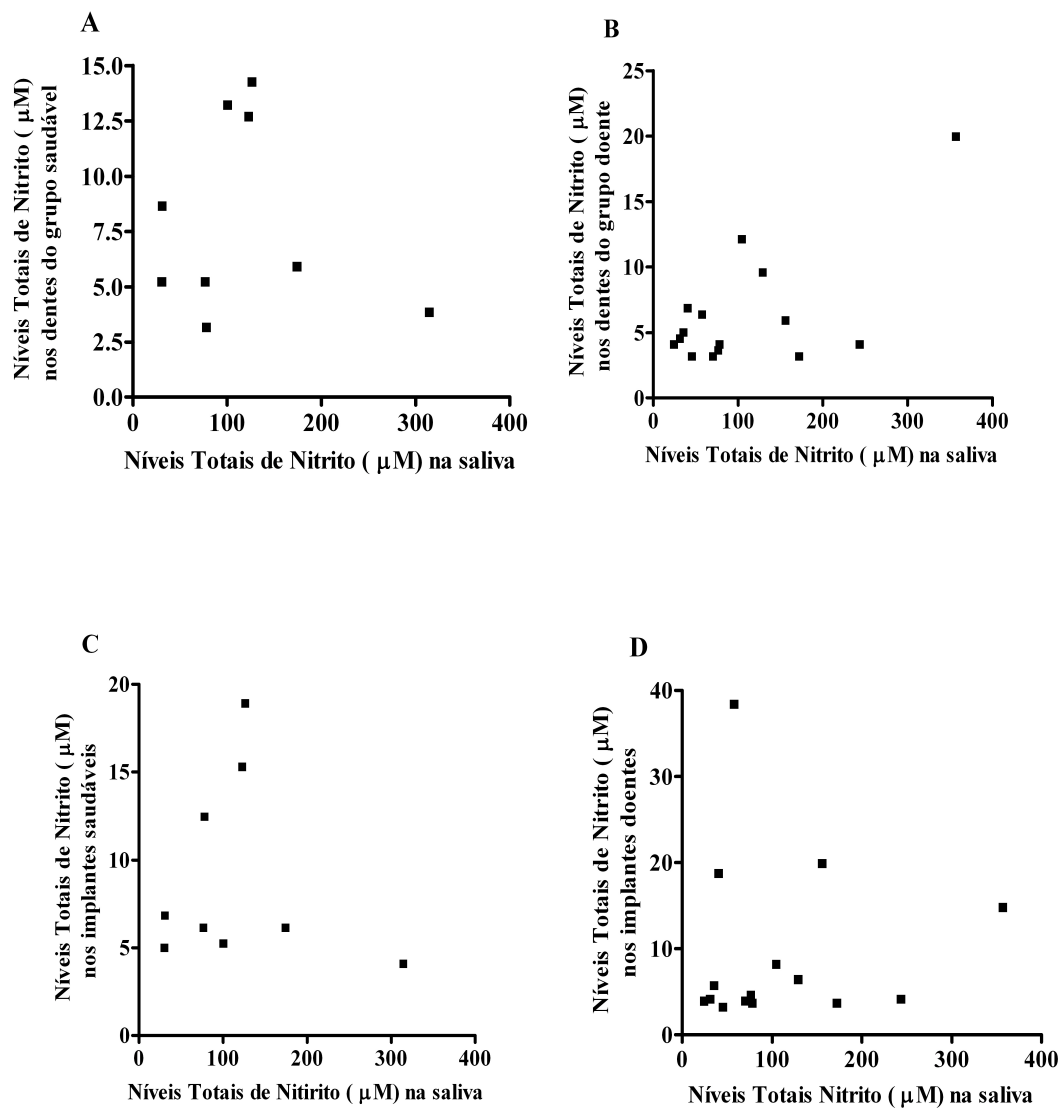


Figura 4. Correlação entre os níveis de nitrito no fluido sulcular e na saliva. A, B - correlação entre os níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular de dentes dos grupos saudável (A) ou doente (B). C, D - correlação entre os níveis de nitrito na saliva e no fluido sulcular de implantes dos grupos saudável (A) ou doente (B).

6. Discussão

A mucosa peri-implantar é constituída por tecidos moles que circundam os implantes intra-ósseos formando um colar aderente com uma densa lâmina própria de colágeno, revestida por epitélio. A porção da mucosa peri-implantar voltada para a cavidade oral é revestida por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A porção em contato com o implante é revestida por epitélio estratificado não-queratinizado, na região do sulco periimplantar. A junção implante-mucosa é constituída por epitélio estratificado cujas células epiteliais aderem ao implante por meio de hemidesmossomos e lâmina basal, semelhantemente ao epitélio juncional presente nos dentes naturais (Bernard *et al.*, 1997; Lindhe & Berglundh, 1999).

A semelhança dos epitélios sulcular e juncional na região peri-implantar com os encontrados nos dentes naturais indica que a formação desses epitélios não requer a presença de estruturas dentais. Em especial, o estabelecimento do epitélio juncional ao redor do implantes, ou mesmo nos dentes após várias cirurgias periodontais, indica que a formação deste tecido não depende do epitélio odontogênico (Weber & Cochran, 1998). Assim, o epitélio juncional provavelmente é formado como defesa do organismo em resposta à exposição causada pela cirurgia, estabelecendo um selamento biológico.

O tecido gengival resiste às constantes agressões bacterianas e mecânicas as quais está sujeito devido aos mecanismos de defesa natural. Entre esses mecanismos estão: a secreção salivar, o fluido gengival, a superfície epitelial, com os seus variados graus de queratinização e os estágios iniciais da resposta inflamatória (Carranza & Bulkacz, 1997).

O sucesso a longo prazo dos implantes dentais depende da saúde contínua dos tecidos peri-implantares e de uma distribuição adequada de força sobre os implantes (Jovanovic, 1997; Liskmann *et al.*, 2006). As perdas tardias de implantes, causadas por doenças peri-implantares, estão entre as principais preocupações dos implantodontistas. De modo geral, exames clínicos e sinais radiográficos de perda óssea são usadas para o diagnóstico e monitoramento

da progressão da doença peri-implantar (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Yalçın *et al.*, 2005; Strbac *et al.*, 2006). Entretanto, esses métodos fornecem limitadas informações sobre o dinâmico mecanismo fisiopatológico da doença peri-implantar, não sendo possível estabelecer os limites entre o início da doença, ainda em estágio subclínico, e sua progressão. Assim, testes simples e objetivos baseados em marcadores biológicos representam uma alternativa de monitoramento da saúde do tecido peri-implantar durante consultas de controle (Paolantonio *et al.*, 2000; Liskmann *et al.*, 2004, Yalçın *et al.*, 2005; Strbac *et al.*, 2006).

Neste estudo foram selecionados indivíduos desdentados parciais reabilitados com implantes osseointegrados, uma vez que existem diferenças entre indivíduos desdentados parciais e totais, sobretudo na composição microbiana da cavidade oral. Em indivíduos totalmente desdentados ocorre redução de microorganismos periodontais no sulco da mucosa peri-implantar, tornando os indivíduos menos susceptíveis à peri-implantites quando comparados com os parcialmente desdentados (Jovanovic, 1997; Weber & Cochran 1998).

O presente estudo utilizou parâmetros clínicos tradicionais para determinar as condições de saúde peri-implantar em um grupo de indivíduos com diferentes sistemas de implantes dentais (Liskmann *et al.*, 2004; Strbac *et al.*, 2006). Os parâmetros analisados foram associados à quantificação de um marcador bioquímico da inflamação e da remodelação óssea – o óxido nítrico, que foi quantificado na saliva e no fluido sulcular de dentes e implantes como nível total de nitrito. O nitrito (NO_2^-) é um metabólito estável do NO e que recentemente vem sendo utilizado no diagnóstico de doenças (Leitão *et al.*, 2005; Gyurko *et al.*, 2005; Tozum *et al.*, 2005, Bryan & Grisham, 2007).

Os parâmetros clínicos escolhidos para análise (SS, PS e PV) consideram a realidade de clínicas dentais privadas, onde métodos simples e rápidos são utilizados para acompanhamento clínico. Estudos anteriores utilizaram esses parâmetros para determinar a condição de saúde peri-implantar (Leonhardt *et al.*, 2002; Paolantonio *et al.*, 2000; Liskmann *et al.*, 2006).

A profundidade de sondagem (PS) foi o único parâmetro clínico que mostrou diferença estatística em todas as análises (dente versus implantes e implantes saudáveis versus doentes). Esses resultados estão de acordo com a literatura, em que estudos mostraram profundidade de sondagem significativamente maior em torno dos implantes do que ao redor dos dentes (Karoussis *et al.*, 2004; Machtei *et al.*, 2006). Uma possível explicação para estes resultados, reside nas diferenças anatômicas e histológicas entre dentes e implantes (Lindhe & Berglundh, 1999; Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003b; Machtei *et al.*, 2006), uma vez que a adesão entre a mucosa peri-implantar e a superfície do implante é mais frágil que a entre dente e gengiva. Isso se deve ao fato dos implantes não apresentarem cimento e nem fibras colágenas perpendiculares, sendo grande parte das fibras dispostas paralelas à superfície do implante (Bernard *et al.*, 1997; Koka, 1998; Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999; Groisman & Vidigal Jr, 2004). Dessa forma, durante a sondagem, a mucosa peri-implantar é deslocada principalmente na direção lateral, o que faz com que a sonda, penetre mais profundamente ao redor dos implantes do que nos dentes naturais (Weber & Cochran 1998; Lindhe & Berglundh, 1999; Machtei *et al.*, 2006).

Os outros dois parâmetros utilizados, SS e PV, não mostraram diferenças significantes entre dentes e implantes. Apesar destes parâmetros (SS e PV) terem sido utilizados em estudos anteriores (Leonhardt *et al.*, 2002; Liskmann *et al.*, 2004), aparentemente eles não representam indicadores precisos da inflamação peri-implantar. De acordo com Ericsson & Lindhe (1993), freqüentemente ocorre sangramento à sondagem (SS) mesmo ao redor de implantes saudáveis. Além disso, as diferenças na inserção dos dentes e implantes contra-indicam este parâmetro nas comparações entre esses sítios.

A presença de placa visível (PV) foi avaliada nos implantes, sendo identificada tanto no grupo saudável, quanto no doente, e não houve diferenças estatísticas entre eles. Este resultado pode estar relacionado com o critério utilizado para registrar o índice de placa, uma vez que o PV só foi registrado como presente ou ausente. Assim, mesmo pequenas quantidades de placa resultaram em um índice total de placa elevado.

Exames clínicos não são suficientes para determinar a presença da doença peri-implantar antes de danos clínicos extensos. No sentido de contribuir com o entendimento e diagnóstico precoce de doença peri-implantar, o presente estudo analisou dois fluidos corporais, saliva e fluido sulcular, envolvidos na defesa imune da cavidade oral (Paolantonio *et al.*, 2000; Kaufman & Lamster 2000; Loos & Tjoa 2005; Liskmann *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, a saliva tem sido proposta como um potencial instrumento para diagnosticar e determinar a atividade da doença periodontal (Kaufman & Lamster 2000, Ozmeric 2004; Mashayekhi *et al.*, 2005), no entanto poucos estudos avaliaram marcadores salivares nas peri-implantites (Liskmann *et al.*, 2006, 2007). A maior parte dos testes de diagnóstico para peri-implantites ou risco do paciente para esta doença, analisaram componentes do fluido sulcular (Liskmann *et al.*, 2004). Na presente pesquisa, foi avaliado o nível de nitrito tanto na saliva quanto no fluido sulcular peri-implantar (FSPI) visando determinar semelhanças e diferenças entre eles, bem como seu papel como possível marcador bioquímico no diagnóstico precoce de destruição tecidual ao redor dos implantes. Além disso, comparamos o nível de nitrito nos dentes e implantes, dois sítios considerados similares e com marcadores correspondentes (Kivela-Rajamaki *et al.*, 2003a; Liskmann *et al.*, 2004).

O presente estudo comprovou as semelhanças entre os sítios periodontais e peri-implantares quanto à dosagem de nitrito, não existindo diferença estatisticamente significativa entre eles, em ambos os grupos, saudável e doente. No entanto, uma vez que todos os dentes apresentaram características clínicas que permitiram sua classificação como saudáveis (ausência de doença periodontal), seria esperada uma diferença significativa nos níveis de nitrito entre dentes e implantes. Uma possível explicação para este resultado reside nos parâmetros clínicos escolhidos para classificar os dentes e os implantes, visto que todos os dentes controle foram considerados saudáveis baseados nos valores de profundidade de sondagem e na ausência de perda óssea radiográfica. Os parâmetros clínicos SS e PV não foram considerados entre os critérios para selecionar os dentes controle, visto que o interesse principal era não incluir indivíduos com periodontite. Assim, pode-se

especular que, se os implantes e os dentes fossem classificados de acordo com o grau de inflamação (ex.: mucosites, peri-implantites e periodontites), as diferenças entre os níveis de nitrito poderiam ser significantes. Resultados semelhantes foram obtidos quando comparados os fluidos dos implantes nos diferentes grupos (saudável e doente). O nível de nitrito foi maior nos sítios peri-implantares doentes, do que nos sítios saudáveis, mas sem diferenças significativas.

Tozum *et al.* (2005, 2007) observaram diferenças significantes entre os níveis de nitrito no FSPI dos sítios inflamados quando comparados com os saudáveis. No entanto, esses autores utilizaram critério diferente, classificando os implantes em grupos saudável ou inflamado, de acordo com a severidade da inflamação. Este estudo foi realizado em indivíduos reabilitados com overdenture e, devido às dificuldades de higienização, é comum encontrar até mesmo mucosites mais severas nestes casos. Assim, baseado nos resultados obtidos, podemos especular que, em sítios mais inflamados, os níveis de nitrito seriam mais elevados do que os encontrados no presente estudo.

No grupo doente, nossos resultados não demonstraram nenhuma correlação entre o nível de nitrito presentes nos fluidos gengival ou peri-implantar e qualquer um dos parâmetros clínicos avaliados. Já no grupo saudável, correlação negativa significativa foi encontrada entre os índices de placa visível (PV) e os implantes saudáveis. Curiosamente, neste grupo, apenas dois indivíduos apresentaram implantes com presença de placa visível, os quais corresponderam aos mais elevados níveis de nitrito. Estes dados estão de acordo com Carossa *et al.* (2001) e confirmam a necessidade de reforçar a higienização dos indivíduos, a fim de evitar a destruição dos tecidos por mediadores locais da inflamação, tais como o nitrito.

O acúmulo de placa na superfície dos implantes pode acarretar em comprometimento do epitélio, que parece tornar-se ulcerado e perder aderência, além de promover aumento do infiltrado inflamatório no conjuntivo. Persistindo a presença da placa, surgem sinais clínicos e radiográficos de destruição tecidual, podendo comprometer o prognóstico do implante, visto que

a inflamação nos tecidos peri-implantares evolui mais rapidamente que nos periodontais (Jovanovic, 1997).

O controle da placa dental deve começar imediatamente após a exposição do implante na cavidade oral e ser constantemente monitorado, uma vez que coroas protéticas instaladas sobre os implantes são freqüentemente volumosas e sobrecontornadas, o que dificulta a higienização. Especialmente nos casos de perda dental devido à doenças periodontais ou cáries, deve-se buscar maior conscientização devido ao histórico de higienização inadequada ou insuficiente (Jovanovic, 1997).

Os critérios utilizados para incluir os implantes no grupo doente, foram apenas a profundidade de sondagem (PS) e a presença de sangramento durante este procedimento (SS). Dessa forma, os implantes classificados como inflamados, poderiam ou não apresentar índice de placa visível (PV), conforme mostra a Tabela 1. Isso pode justificar a ausência de correlação entre PV e os níveis de nitrito no FSPI, uma vez que nem todos os implantes deste grupo apresentavam placa visível.

Outras duas considerações importantes no que se referem ao nível de nitrito presente no fluido sulcular dos dentes e implantes estão relacionadas com a forma de expressão do nível e o volume do FSPI. Neste estudo, não foi calculado o volume do FSPI, embora trabalhos anteriores tenham demonstrado que sítios inflamados apresentam uma quantidade maior de FSPI quando comparado com sítios saudáveis (Strbac *et al.*, 2006). No presente estudo, os dados foram apresentados como nível total de nitrito, os quais independem do volume e foram considerados por Yamalik *et al.* (2000) e Tozum *et al.* (2005) como uma forma mais apropriada de apresentação dos dados.

Quanto ao nível de nitrito na saliva, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os implantes classificados como saudáveis e doentes, embora o nível de nitrito estivesse mais elevado no grupo doente. Estes resultados conflitam com estudos de Ozmeric (2004) e Ugar-Çankal & Ozmeric (2006) que observaram níveis de nitrito salivar mais altos no grupo saudável do que no doente, o que refletiria uma proteção inespecífica na cavidade oral, tornando-a menos susceptível às patologias periodontais.

Segundo Carossa *et al.* (2001), em indivíduos com dentes naturais saudáveis, a deposição de placa dental estaria associada ao aumento significativo do NO oral e dos nitritos salivares. Entretanto, nas periodontites, a atividade aumentada da arginase salivar, enzima relacionada à produção de NO, implicaria em redução na síntese de NO, levando à diminuição na propriedade antibacteriana da saliva e conseqüentemente, tornando os tecidos periodontais mais suscetíveis aos patógenos existentes (Brennan *et al.*, 2003; Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006). Caso estes patógenos sejam bactérias patogênicas, eles podem super-regular a síntese de NO (Leitão *et al.*, 2005).

Do mesmo modo que nas amostras de FSPI, os resultados das análises salivares parecem ter sido influenciados pelos critérios de distribuição dos indivíduos. No entanto, não há consenso na literatura quanto à melhor forma de agrupar os indivíduos como saudável ou doente, levando em consideração as limitações dos exames clínicos utilizados rotineiramente nas clínicas privadas. Além disso, a ausência de diferenças observadas neste estudo para o nitrito salivar em ambos os grupos poderia estar relacionada à mecanismos envolvidos no metabolismo do óxido nítrico (Ugar-Çankal & Ozmeric, 2006) que não estão plenamente explicados, além da possível interferência de outros componentes e mediadores salivares.

Embora vários estudos tenham demonstrado múltiplas funções do NO salivar, o presente estudo é o primeiro na tentativa de estabelecer relação entre nível de nitrito salivar e doença peri-implantar em indivíduos desdentados parciais. Apesar da ausência de correlação entre o nível de nitrito salivar e os parâmetros clínicos avaliados, bem como entre os níveis de nitrito no fluido sulcular e na saliva, sua utilização como método de análise complementar no prognóstico de implantes não foi descartada. A ausência de correlação pode ter sido influenciada por ser o estudo em humanos, onde existe uma gama de variáveis que podem interferir no resultado, mesmo tendo sido aplicados critérios de inclusão e exclusão, na tentativa de delimitar e homogeneizar ao máximo a amostra.

Outra alternativa de investigação para compreender a função do NO, seria através de estudos em modelos experimentais, em que fosse possível

analisar o seu papel de forma isolada sem interferência de outros componentes, entretanto, isso não corresponderia à realidade da cavidade oral.

A complexidade da cavidade oral, contendo uma diversidade de mediadores inflamatórios, tais como: citocinas, enzimas e fatores de crescimento, além de fatores hormonais, criam um microambiente capaz de interferir inibindo ou potencializando a ação do óxido nítrico. Além disso, em indivíduos idosos em geral a perda dental ocorre devido à doença periodontal, o que sugere que eles possuam fatores, como por exemplo microorganismos colonizadores, que os tornem mais susceptíveis à inflamações peri-implantares, principalmente se estes já apresentarem histórico de higienização deficitária.

O estudo em humanos também está sujeito às características individuais, seja na diversidade de suas respostas imunes ou até mesmo nas diferenças de metabolismos. Mesmo se tratando de uma faixa etária não muito ampla, com indivíduos com idades entre 25 a 45 anos, existe uma variação no metabolismo desses indivíduos e de forma ainda desconhecida esse fator pode interferir nos resultados. Entretanto, o presente estudo realizou comparações intrínsecas, considerando a mucosa periodontal e peri-implantar no mesmo indivíduo, o que elimina diferenças sistêmicas.

O óxido nítrico tem papel protetor na cavidade oral, mas também pode promover a destruição dos tecidos. Esse limiar entre a citoproteção e a citotoxicidade do NO é tênue, sendo assim sua detecção e quantificação precisas são importantes para o entendimento de saúde e doença (Bryan & Grisham, 2007). Em condições fisiológicas, o NO possui função importante na defesa inespecífica do hospedeiro, bem como na destruição de patógenos intracelulares e células tumorais (Tozum *et al.*, 2005). No entanto, na presença de um superóxido (O_2^-), o óxido nítrico reage formando um dos mais poderosos oxidantes, o peroxinitrito (ONOO) e este provavelmente seja o motivo pelo qual o NO responde de maneira diferente em condições fisiológicas e patológicas.

In vivo, de maneira isolada, nem o superóxido (O_2^-) e nem o óxido nítrico (NO) são tóxicos, pois o próprio organismo possui mecanismos eficazes para minimizar a acumulação dessas moléculas. O superóxido é rapidamente

removido por altas concentrações de enzimas localizadas em compartimentos extracelulares, ou mesmo no interior das células, nas mitocôndrias e no citoplasma. Já o NO é um radical livre, que atua como importante mensageiro intercelular, mas que possui uma vida-curta no sistema biológico, pois se difunde facilmente, sendo rapidamente convertido e oxidado em uma variedade de óxidos de nitrogênio, como o nitrito. Entretanto, quando o superóxido e o NO são sintetizados próximos um do outro, eles se combinam espontaneamente e, através de uma reação difusão-limitada, originam o peroxinitrito. Assim, cada vez que o óxido nítrico (NO) e superóxido colidem, eles formam o peroxinitrito (ONOO), não sendo necessário nenhum tipo de enzima, mesmo porque nenhuma enzima poderia catalisar uma reação tão rápida. Em geral, na literatura o NO é discutido como um agente sinalizador fisiológico. No entanto, muitos dos efeitos biológicos atribuídos ao óxido nítrico (NO) são na verdade, mediados pelo peroxinitrito (Pacher *et al.*, 2007; Wiley, 2007).

Todas essas análises moleculares, feitas em laboratórios, não têm como objetivo substituir os exames clínicos utilizados rotineiramente nas clínicas odontológicas, mas o intuito de contribuir complementando exames sem contudo descartá-los. Dessa forma, dados clínicos relacionados aos níveis de NO salivar e do fluido, podem elucidar o padrão de resposta biológica, indicando como alterações em marcadores biológicos poderiam auxiliar no diagnóstico clínico. Assim, contribuindo não somente para detecção precoce da doença, uma vez que acrescenta valiosas informações sobre o estado subclínico dos implantes, mas cooperando também na prevenção das peri-implantites.

Devido ao importante papel do NO no metabolismo ósseo e na inflamação, mais estudos são necessários para comprovar sua relevância como marcador no diagnóstico inicial ou no prognóstico dos implantes. Sugerimos também um acompanhamento longitudinal do perfil de nitrito na saliva e no FSPI a fim de confirmar o presente estudo.

7. Conclusão

De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos, é possível concluir que o nível de nitrito presente no fluido peri-implantar e na saliva não apresenta correlação com os parâmetros clínicos de avaliação da mucosa peri-implantar.

Referências^{*}

Adell R, Lekholm U, Rockler B , Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int J Oral Surg** 1981; 10 (6): 387-416.

Amarante ES, de Lima LA. [Optimization of implant surfaces: titanium plasma spray and acid-etched sandblasting -- current status]. **Pesqui Odontol Bras** 2001; 15 (2): 166-173.

Avery JK. **Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal. Uma abordagem clínica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Berglundh T, Donati M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. **J Clin Periodontol** 2005; 32 Suppl 6: 87-107.

Bernard GW, Carranza FAJr, Jovanovic SA. Aspectos biológicos dos implantes dentários. In: Carranza FAJr, Newman MG. **Periodontia Clínica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.732-737.

Boras VV, Brailo V, Lukac J, Kordic D , Blazic-Potocki Z. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with burning mouth syndrome. **Oral Dis** 2006; 12 (3): 353-355.

Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. **Arch Oral Biol** 2003; 48 (2): 93-100.

Brunette DM, Chehroudi B. The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo. **J Biomech Eng** 1999; 121(1): 49-57.

Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med** 2007; 43 (5): 645-657.

Carossa S, Pera P, Doglio P, Lombardo S, Colagrande P, Brussino L, Rolla G, Bucca C. Oral nitric oxide during plaque deposition. **Eur J Clin Invest** 2001; 31 (10): 876-879.

^{*} De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Carranza FAJr, Bulkacz J. Mecanismos de defesa da gengiva. In: Carranza FAJr, Newman MG. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.108-115.

Cauwels A. Nitric oxide in shock. **Kidney Int** 2007; 72 (5): 557-565.

Cole MF, Hsu SD, Baum BJ, Bowen WH, Sierra LI, Aquirre M , Gillespie G. Specific and nonspecific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. **Infect Immun** 1981; 31(3): 998-1002.

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ** 2003; 67 (8): 932-949.

Ebersole JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. **Periodontol 2000** 2003; 31: 135-166.

Ericsson I, Lindhe J. Probing depth at implants and teeth. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol** 1993; 20 (9): 623-627.

Ferraris MEG, Muñoz AC. **Histologia e embriologia bucodental**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Franchi M, Fini M, Martini D, Orsini E, Leonardi L, Ruggeri A, Giavaresi G , Ottani V. Biological fixation of endosseous implants. **Micron** 2005; 36 (7-8): 665-671.

Gomes MA, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, Buso AM, Silva AG, Favoreto S, Jr., Souza MA. Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. **J Periodontal Res** 2006; 41 (3): 177-183.

Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. **Periodontol 2000** 2003; 31: 43-54.

Goutoudi P, Diza E , Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. **J Dent** 2004; 32 (7): 511-520.

Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. **Periodontol 2000** 2003; 31: 32-42.

Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR, Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol** 1996; 268: 237-246.

Groisman M, Vidigal Jr GM. Estética periimplantar. In: Querido MRM, Fan, YL (coord) **Implantes osseointegrados – Inovando soluções**. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p.37-56.

Gruica B, Wang HY, Lang NP , Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. **Clin Oral Implants Res** 2004; 15 (4): 393-400.

Gürkan A, Emingil G, Çınarcık S, Berdeli A. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in several forms of periodontal disease. **Arch Oral Biol** 51 (10): 906-912, 2006.

Gyurko R, Shoji H, Battaglino RA, Boustany G, Gibson FC, 3rd, Genco CA, Stashenko P, Van Dyke TE. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and P. gingivalis-induced alveolar bone loss. **Bone** 2005; 36 (3): 472-479.

Hagewald S, Bernimoulin JP, Kottgen E , Kage A. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. **J Periodontal Res** 2002; 37 (5): 333-339.

Hagewald SJ, Fishel DL, Christan CE, Bernimoulin JP , Kage A. Salivary IgA in response to periodontal treatment. **Eur J Oral Sci** 2003; 111 (3): 203-208.

Hofling JC, Gonçalves RB. **Imunologia para Odontologia**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A. 2006, p.274-284.

Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R , Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clin Exp Immunol** 2006; 144 (1): 35-40.

Itoiz MA, Carranza FAJr. A gengiva. In: Carranza FAJr, Newman MG. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 12-31.

Jespersgaard C, Hajishengallis G, Russell MW , Michalek SM. Identification and characterization of a nonimmunoglobulin factor in human saliva that inhibits Streptococcus mutans glucosyltransferase. **Infect Immun** 2002; 70 (3): 1136-1142.

Jovanovic SA. Diagnóstico e tratamento da doença periimplantar. In: Carranza FAJr, Newman MG. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.757-768.

Karoussis IK, Muller S, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Lang NP. Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-year prospective study. **Clin Oral Implants Res** 2004; 15 (1): 1-7.

Katchburian E, Arana V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. **J Clin Periodontol** 2000; 27 (7): 453-465.

Kinane DF, Lindhe J. Patogênese da periodontite. In: Lindhe J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.127-152.

Kivela-Rajamaki M, Maisi P, Srinivas R, Tervahartiala T, Teronen O, Husa V, Salo T, Sorsa T. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. **J Periodontol Res** 2003; 38 (6): 583-590.

Kivela-Rajamaki MJ, Teronen OP, Maisi P, Husa V, Tervahartiala TI, Pirila EM, Salo TA, Mellanen L, Sorsa TA. Laminin-5 gamma2-chain and collagenase-2 (MMP-8) in human peri-implant sulcular fluid. **Clin Oral Implants Res** 2003; 14 (2): 158-165.

Koka S. The implant-mucosal interface and its role in the long-term success of endosseous oral implants: a review of the literature. **Int J Prosthodont** 1998; 11 (5): 421-432.

Konradsson K, van Dijken JW. Interleukin-1 levels in gingival crevicular fluid adjacent to restorations of calcium aluminate cement and resin composite. **J Clin Periodontol** 2005; 32 (5): 462-466.

Leitao RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FA, Lima V, Brito GA. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol** 2005; 76 (6): 956-963.

Leonhardt A, Grondahl K, Bergstrom C, Lekholm U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. **Clin Oral Implants Res** 2002; 13 (2): 127-132.

Li LH, Kong YM, Kim HW, Kim YW, Kim HE, Heo SJ, Koak JY. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. **Biomaterials** 2004; 25 (14): 2867-75.

Lindhe J, Berglundh T. A mucosa do periimplante. In: Lindhe J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.631-639.

Liskmann S, Zilmer M, Vihalemm T, Salum O, Fischer K. Correlation of peri-implant health and myeloperoxidase levels: a cross-sectional clinical study. **Clin Oral Implants Res** 2004; 15 (5): 546-552.

Liskmann S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2006; 21 (4): 543-550.

Liskmann S, Vihalemm T, Salum O, Zilmer K, Fischer K, Zilmer M. Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. **Clin Oral Implants Res** 2007; 18 (1): 27-33.

Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? **Periodontol 2000** 2005; 39: 53-72.

Ma J, Kittl U, Teronen O, Sorsa T, Huse V, Laine P, Ronka H, Salo T, Lindqvist C, Kontinen YT. Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. **J Dent Res** 2000; 79 (11): 1870-1873.

Machtei EE, Oved-Peleg E, Peled M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implant platforms. **Clin Oral Implants Res** 2006; 17 (6): 658-665.

Martelli FS, Gonçalves F, Zanetti RV, Zanetti AL. Novas perspectivas para o tratamento das doenças periimplantares. In: Querido MRM, Fan, YL (coord) **Implantes osseointegrados – Inovando soluções**. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p.57-77.

Mashayekhi F, Aghahoseini F, Rezaie A, Zamani MJ, Khorasani R, Abdollahi M. Alteration of cyclic nucleotides levels and oxidative stress in saliva of human subjects with periodontitis. **J Contemp Dent Pract** 2005; 6 (4): 46-53.

Murata M, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, Takeda H, Araki H, Shin K, Okuda K, Miyata T, Yoshie H. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Clin Oral Implants Res** 2002; 13 (6): 637-643.

Newman MG, Sanz M, Nisengard RC, Haake SK. Interações hospedeiro-bactérias nas doenças periontais. In: Carranza FAJr, Newman MG. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.125-135.

Nicolau GV, Rapoport A, Selski MAS. Dosagem de interleucina 1β na doença periodontal. **Rev Bras Otorrinolaringol**. 69 (2): 186-191, 2003.

Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. **Clin Chim Acta** 2004; 343 (1-2): 1-16.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev** 2007; 87 (1): 315-424.

Paolantonio M, Di Placido G, Tumini V, Di Stilio M, Contento A, Spoto G. Aspartate aminotransferase activity in crevicular fluid from dental implants. **J Periodontol** 2000; 71 (7): 1151-1157.

Papapanou P N, Lindhe J. Epidemiologia da doença periodontal. In: Lindhe J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.43-65.

Perinetti G, Spoto G. The use of ISO endodontic paper points in determining small fluid volumes. **J Appl Res Clin Dent** 2004; 1(1): 7-11.

Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Reosseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**. 2001; 12 (6): 595-603.

Rhodus NL, Cheng B, Bowles W, Myers S, Miller L, Ondrey F. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. **Oral Dis**. 2006; 12 (2): 112-6.

Robbins RA, Grisham MB. Nitric oxide. **Int J Biochem Cell Biol.** 1997; 29 (6): 857-860.

Simon Z, Watson PA. Biomimetic dental implants--new ways to enhance osseointegration. **J Can Dent Assoc** 2002; 68(5): 286-288.

Siqueira-Jr JF, Sabóia-Dantas CJ. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. In: Siqueira-Jr JF, Sabóia-Dantas CJ. **Inflamação**. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2000. p.238.

Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. **Clin Sci (Lond)** 2003; 105 (2): 167-172.

Strbac GD, Monov G, Cei S, Kandler B, Watzek G, Gruber R. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study. **J Clin Periodontol** 2006; 33 (4): 302-308.

Ten Cate AR. **Histologia bucal - Desenvolvimento, estrutura e função**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Tenovou J. Antimicrobial agents in saliva--protection for the whole body. **J Dent Res** 2002; 81 (12): 807-809.

Tozum TF, Turkyilmaz I, Yamalik N, Tumer C, Kilinc A, Kilinc K, Karabulut E, Eratalay K. 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 (4): 547-556.

Tozum TF, Turkyilmaz I, Yamalik N, Tumer C, Kilinc A, Kilinc K, Karabulut E, Eratalay K. The effect of delayed versus early loading on nitric oxide metabolism around dental implants: an 18-month comparative follow-up study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2007; 22 (1): 53-62.

Tozum TF, Guncu GN, Yamalik N, Turkyilmaz I, Guncu MB. The impact of prosthetic design on the stability, marginal bone loss, peri-implant sulcus fluid volume, and nitric oxide metabolism of conventionally loaded endosseous dental implants: a 12-month clinical study. **J Periodontol** 2008; 79 (1): 55-63.

Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. **Clin Chim Acta** 2006; 366 (1-2): 90-100.

Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M , Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol** 2005; 32 (4): 383-389.

Walker DM. Oral mucosal immunology: an overview. **Ann Acad Med Singapore** 2004; 33 (4 Suppl): 27-30S.

Watzek G. **Implants in qualitatively compromised bone**. São Paulo: Quintessence Publishing Co, 2004, 181p.

Weber HP, Cochran DL. The soft tissue response to osseointegrated dental implants. **J Prosthet Dent** 1998; 79 (1): 79-89.

Wiley JW. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. **Neurogastroenterol Motil** 2007; 19 (7): 541-544.

Wilson AN, Schmid MJ, Marx DB , Reinhardt RA. Bone turnover markers in serum and periodontal microenvironments. **J Periodontal Res** 2003; 38 (4): 355-361.

Xie Y, Liu X, Huang A, Ding C, Chu PK. Improvement of surface bioactivity on titanium by water and hydrogen plasma immersion ion implantation. **Biomaterials** 2005; 26(31): 6129-6135.

Yalçın S, Basegmez C, Mijiritsky E, Yalçın F, Isik G, Onan U. Detection of implant crevicular fluid prostaglandin E2 levels for the assessment of peri-implant health: a pilot study. **Implant Dent** 2005; 14 (2): 194-200.

Yamalik N, Caglayan F, Kilinc K, Kilinc A, Tumer C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J Periodontol** 2000; 71 (3): 460-467.

Anexo



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 370/06

Registro CEP: 181/06

Projeto Pesquisa: “Saliva e fluido crevicular no diagnóstico de doenças perimplantares.”

Pesquisador Responsável: Paula Dechichi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

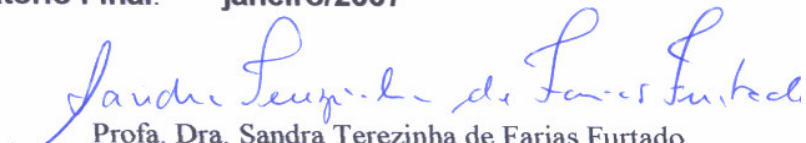
Situação: Projeto aprovado.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.**
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.**

Data para entrega do Relatório Final: **janeiro/2007**

05 de dezembro de 2006.


Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS