



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IL-1 β , TNF- α E PGE2 NO FLUIDO
CREVICULAR PERI-IMPLANTAR COMO MÉTODO AUXILIAR
DE DIAGNÓSTICO DA PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por
Filipa Sousa Coelho Nunes Pinheiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

novembro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE IL-1B, TNF- α E PGE2 NO FLUIDO
CREVICULAR PERI-IMPLANTAR COMO MÉTODO AUXILIAR
DE DIAGNÓSTICO DA PERI-IMPLANTITE**

Trabalho submetido por
Filipa Sousa Coelho Nunes Pinheiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Madalena Salema Oom

e coorientado por
Mestre José Maria Cardoso

novembro de 2022

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste capítulo tão importante na minha vida, não seria possível sem o apoio de diversas pessoas. Assim, deixo um especial agradecimento:

À minha orientadora, a Professora Doutora Madalena Oom, por ter aceitado orientar a minha tese e por se ter demonstrado sempre prestável, disponível e me ter motivado a dar o melhor de mim.

Ao meu coorientador, o Mestre José Maria Cardoso, pela ética de trabalho, rigor e conhecimento partilhados nos últimos meses. Além do incentivo e confiança depositada em mim.

Um eterno obrigada à minha família. À minha mãe e ao meu pai, por todo o amor e valores transmitidos durante o meu crescimento. Agradeço tudo o que fizeram para me propiciarem a oportunidade de tirar este Mestrado, concretizar o meu sonho e acima de tudo, por nunca me terem “cortado as asas”. Às minhas queridas irmãs mais novas, espero um dia poder passar-vos todos estes ensinamentos. E aos meus avós e tios, sempre presentes na minha vida e tão especiais para mim, espero orgulhar-vos.

Ao meu namorado e melhor amigo, um obrigada não é suficiente, não só me ter aturado nos dias de stress e ansiedade, mas também pelo apoio em todos os momentos de conquista e sucesso.

Às minhas amigas do coração e de longa data, as minhas amigas do secundário, com quem eu cresci e vivenciei toda a minha adolescência. Hoje já crescidas e cada uma no seu caminho, contudo sempre unidas. Obrigada pelo vosso apoio incondicional.

À minha colega de box, parceira de todos os dias e amiga para a vida, a minha amiga Mariana (Fu). Foi ao teu lado que tive todas as primeiras experiências como dentista e que aprendi o verdadeiro significado de brio e perfeccionismo no trabalho.

Aos meus queridos amigos do ET5, porque “a faculdade não se faz sozinha”. Obrigada por me terem acompanhado desde o início desta jornada e por alegrarem os meus dias durante o confinamento.

E por fim à Inês, à Mariana, à Rita e à Catarina, o melhor que a Egas me deu, os meus pilares nesta faculdade durante todos estes anos, as companheiras de estudo de todas as horas e compinchas nos momentos de gargalhadas. Até sermos velhinhas.

RESUMO

Atualmente, os implantes dentários são utilizados rotineiramente na prática clínica como uma das principais opções de reabilitação de espaços edêntulos, devido aos seus benefícios funcionais e estéticos a longo prazo. Apesar das elevadas taxas de sucesso e sobrevivência associadas à reabilitação com implantes, podem surgir complicações, nomeadamente a doença peri-implantar, que em última instância leva à falha do implante.

A peri-implantite afeta os tecidos de suporte peri-implantares, ocorrendo inflamação da mucosa e perda de osso de suporte. Os métodos comumente utilizados para diagnosticar esta patologia são complexos na sua aplicação e interpretação, além de não permitirem a especificidade e sensibilidade desejáveis para a detecção precoce da doença. A avaliação e a quantificação dos biomarcadores presentes no fluido crevicular peri-implantar podem complementar este diagnóstico.

Esta revisão narrativa pretendeu analisar a evidência científica existente acerca da associação entre os níveis de interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandina E2 (PGE2) no fluido crevicular peri-implantar e a peri-implantite. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados: *PubMed*, *Cochrane Library*, *Research Gate* e *Elsevier*.

A análise da literatura mostra que a IL-1 β , o TNF- α e a PGE2 desempenham um papel pró-inflamatório fulcral na peri-implantite, sobretudo através da mediação da reabsorção óssea a partir da ativação dos osteoclastos. Por conseguinte, a maioria dos estudos verificou um aumento das suas concentrações no fluido crevicular peri-implantar de localizações afetadas, sendo confirmada a presença de uma associação positiva com a doença, que no futuro deverá ser fortalecida com evidência de mais estudos longitudinais controlados.

A descoberta desta associação e o desenvolvimento de um teste que permita identificá-la no contexto clínico, concede ao Médico Dentista a capacidade de realizar o diagnóstico precoce da peri-implantite, que melhora consideravelmente o prognóstico do seu tratamento.

Palavras-chave: Interleucina-1 beta, Fator de necrose tumoral alfa, Prostaglandina E2 e Peri-implantite.

ABSTRACT

Currently, dental implants are used as one of the main clinical rehabilitation methods for edentulous spaces due to their long-term functional and aesthetic benefits. Despite the high success and survival rates associated with implant rehabilitation, complications can arise, namely peri-implant disease, which ultimately can lead to implant failure.

Peri-implantitis affects the supporting peri-implant tissues, with inflammation of the peri-implant mucosa and loss of supporting bone. The methods commonly used to diagnose this pathology are complex in their application and interpretation, in addition to not allowing the desired specificity and sensitivity for the early detection of the disease. The evaluation and quantification of biomarkers present in the peri-implant crevicular fluid can complement this diagnosis.

This narrative review aimed to analyze the existing scientific evidence about the association between the levels of interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and prostaglandin E2 (PGE2) in the peri-implant crevicular fluid and the peri-implantitis. A bibliographic search was carried out in the following databases: PubMed, Cochrane Library, Research Gate and Elsevier.

The literature review shows that IL-1 β , TNF- α and PGE2 play a key pro-inflammatory role in the establishment of peri-implantitis, mainly from the mediation of bone resorption through activation of osteoclasts. Therefore, most studies have found an increase in their concentrations in the peri-implant crevicular fluid of affected locations, confirming the presence of a positive association with the disease which in the future should be strengthened with additional evidence from controlled longitudinal studies.

The discovery of this association and the development of a test that allows it to be identified in the clinical context, gives the Dentist the ability to perform an early diagnosis of peri-implantitis, which considerably improves the prognosis of its treatment.

Keywords: Interleukin-1 beta, Tumor necrosis factor alpha, Prostaglandin E2 and Peri-implantitis.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	13
II. DESENVOLVIMENTO	15
1. Peri-Implantite	15
1.1 Definição de Peri-Implantite, Mucosite Peri-Implantar e Saúde Peri-Implantar	15
1.2 Características Clínicas da Peri-Implantite	16
1.3 Características Histopatológicas da Peri-Implantite.....	17
1.4 Características Microbiológicas da Peri-Implantite	17
1.5 Fatores e Indicadores de Risco.....	19
1.6 Prevalência.....	20
2. Fluido Crevicular Gengival e Fluido Crevicular Peri-Implantar.....	21
3. Biomarcadores no Fluido Crevicular Peri-Implantar	24
4. Papel Pró-Inflamatório dos Mediadores: IL-1β, TNF-α e PGE2	25
4.1 Citoquinas Pró-Inflamatórias: IL-1 β e TNF- α	25
4.2 Prostaglandina E2	28
5. Associação Entre os Níveis de IL-1β, TNF-α e PGE2 e a Peri-implantite	29
6. Meios de Recolha e Quantificação do Volume do Fluido Crevicular Peri-Implantar	40
7. Análise do Conteúdo Imunológico do Fluido – Técnicas – ELISA e Luminex	44
III. CONCLUSÃO	49
IV. BIBLIOGRAFIA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos envolvidos na degradação dos tecidos peri-implantares, desencadeados pela IL-1 β e TNF- α . Adaptado de (Graves & Cochran, 2003).....	28
Figura 2: Periopaper inserido no sulco/bolsa contaminado com sangue.	41
Figura 3: Periotron 8000 (Oraflow Inc., New York, NY, USA).....	42
Figura 4: Exemplo de curva de calibração.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Mediadores inflamatórios libertados no fluido crevicular gengival na inflamação. Adaptado de (Rahnama et al., 2014)..... 23

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite. 33

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cm: centímetros

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FCG: fluido crevicular gengival

FCPI: fluido crevicular peri-implantar

HS: hemorragia à sondagem

IL-1: interleucina-1

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-17: interleucina-17

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-2: interleucina-2

IL-23: interleucina-23

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

LC/MS: cromatografia líquida/espectrometria de massa

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem

M-CSF: fator estimulador de colónias de macrófagos humano

mm: milímetros

MMP: metaloproteinases de matriz

MMP1: metaloproteinase de matriz 1

MMP13: metaloproteinase de matriz 13

MMP8: metaloproteinase de matriz 8

MMP9: metaloproteinase de matriz 9

MPI: mucosite peri-implantar

MS: espectrometria de massa

OPG: osteoprotegerina

PGE2: prostaglandina E2

PI: peri-implantite

PMNs: neutrófilos polimorfonucleares

PO: pressão osmótica

POG: pressão osmótica gengival

PS: profundidade de sondagem

RANK: recetor ativador do fator nuclear kappa-B

RANKL: ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B

Recetor CSF-1: recetor do fator estimulador de colónias-1

Runx2: fator-2 transcrição *Runt-related*

TGF- β tipo III: fator de transformação do crescimento beta tipo III

Th1: células T auxiliares 1

Th17: células T auxiliares 17

Th2: células T auxiliares 2

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

WB: Western blotting

μ l: microlitros

I. INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentários para suporte de prótese fixas e removíveis é vista como uma solução estética e funcional com resultados previsíveis no tratamento da perda dentária, devido à sua capacidade de osteointegração e estabilidade (Charalampakis & Belibasakis, 2015; da Silva et al., 2011; Javed & Almas, 2010; The American Academy of Periodontology [AAP], 2013). Assim, a reabilitação de espaços edêntulos, parciais ou totais, suportada por implantes, tem registado um aumento significativo na prática clínica dos últimos 20 anos, sendo estimada a colocação de mais de cinco milhões de implantes por ano (Renvert et al., 2018; Shimchuk et al., 2020; AAP, 2013). Atualmente, a prevalência de implantes dentários aumenta cerca de 14% ao ano e espera-se que atinja valores de 23% no ano de 2026 (Kormas et al., 2020).

Contudo, é importante referir que os implantes dentários não são imunes às complicações que podem resultar de um planeamento inadequado do tratamento, do procedimento cirúrgico e pós-cirúrgico, da reabilitação protética e da ausência de consultas de manutenção periódicas (AAP, 2013). Além disso, os implantes são pilares artificiais cuja superfície está propensa à formação de biofilmes orais, o que pode resultar em processos inflamatórios e na consequente destruição dos tecidos peri-implantares (Charalampakis & Belibasakis, 2015). Isto é, com o aumento do recurso à Implantologia, surgiu da mesma forma, um número crescente de casos de insucesso e falhas dos implantes, causado em parte pelo aparecimento de doenças peri-implantares (Alassy et al., 2019; AAP, 2013). Por conseguinte, torna-se fulcral a deteção precoce e o tratamento destas patologias (Gürlek et al., 2017).

No âmbito do *Workshop* Mundial de 2017 sobre a Classificação de Doenças Periodontais e Doenças e Condições Peri-implantares o grupo de trabalho nº4 definiu a peri-implantite (PI) como uma condição patológica associada à acumulação de placa que ocorre nos tecidos de suporte peri-implantares, caracterizada pela inflamação da mucosa e subsequente perda progressiva do osso de suporte (Berglundh et al., 2018).

O conjunto de parâmetros clínicos e radiográficos, tais como a profundidade de sondagem (PS), a hemorragia à sondagem (HS), a supuração, a mobilidade e a perda óssea são utilizados para diagnosticar a PI (Schwarz et al., 2018). Todavia, além de não serem específicos, nem sensíveis o suficiente, estes métodos de diagnóstico podem ser complexos de realizar e de interpretar (Duarte et al., 2016).

O fluido crevicular peri-implantar (FCPI) é um biofluido facilmente obtido através de métodos de recolha não invasivos e com potencial para a deteção precoce da PI, devido à presença de moléculas na sua composição, que podem ser usadas como biomarcadores (Gürlek et al., 2017). Segundo o *Biomarkers Definitions Working Group* (2001) um biomarcador, ou marcador biológico, é considerado “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”. Diversos estudos comprovaram o aumento da concentração de determinados biomarcadores no FCPI nos locais de inflamação e degradação tecidular, comparativamente às localizações saudáveis (Gürlek et al., 2017).

As citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) têm sido investigadas como marcadores bioquímicos da PI em diversos estudos clínicos face à sua concentração visivelmente elevada no FCPI de localizações doentes (Faot et al., 2015). Relativamente ao papel que estas citocinas exercem no desenvolvimento da doença peri-implantar destacam-se, a indução da expressão de moléculas de adesão endotelial e de outros mediadores que facilitam e amplificam a resposta inflamatória, e a estimulação das metaloproteinases de matriz e reabsorção óssea (Graves & Cochran, 2003; Petković et al., 2010). A prostagladina E2 (PGE2) é um metabolito do ácido araquidónico que apresenta também efeitos na PI, nomeadamente na vasodilatação, no aumento da permeabilidade vascular em locais de inflamação, na ativação dos osteoclastos e na regulação da reabsorção óssea (Alkan et al., 2016). De acordo com Basegmez et al. (2012) a maioria dos estudos transversais e retrospectivos estão em concordância no que diz respeito ao aumento dos níveis da PGE2 no FCPI de pacientes com peri-implantite.

A seguinte revisão narrativa da literatura tem como objetivo analisar a evidência científica existente acerca da associação entre os níveis de IL-1 β , TNF- α e PGE2 no FCPI e a peri-implantite. Além disso, pretende avaliar o papel destes mediadores inflamatórios enquanto meios complementares de diagnóstico e de controlo da doença.

Como tal, procurou-se alcançar um melhor entendimento relativamente à PI e as suas características, prevalência e fatores de risco, bem como do FCPI e da sua composição em termos de biomarcadores, em particular da IL-1 β , TNF- α e PGE2.

II. DESENVOLVIMENTO

1. Peri-Implantite

1.1 Definição de Peri-Implantite, Mucosite Peri-Implantar e Saúde Peri-Implantar

No decorrer do *Workshop* Mundial de 2017 sobre a Classificação de Doenças Periodontais e Doenças e Condições Peri-implantares, a peri-implantite foi definida como sendo uma condição patológica associada à acumulação de placa bacteriana que ocorre nos tecidos peri-implantares, caracterizada pela inflamação da mucosa adjacente e pela perda progressiva de osso de suporte (Berglundh et al., 2018; Caton et al., 2018; Schwarz et al., 2018). A PI resulta da interação entre as bactérias e os tecidos de suporte do implante e da consequente resposta imune do hospedeiro (Faot et al., 2015).

O diagnóstico da PI é frequentemente realizado no decorrer das consultas de rotina, sendo esta maioritariamente assintomática (Klinge et al., 2005). Clinicamente, o método convencional empregado para avaliar a saúde dos implantes consiste, não só na utilização de uma sonda periodontal para medição da profundidade de sondagem e a concomitante análise do grau de inflamação dos tecidos moles através da hemorragia à sondagem, bem como na identificação da perda óssea a partir de radiografias (Alassy et al., 2019; Schwarz et al., 2018).

A mucosite peri-implantar (MPI) precede a PI, de forma idêntica à evolução da gengivite para periodontite, tratando-se assim, de uma condição inflamatória que afeta os tecidos moles em redor do implante, no entanto, sem que haja perda de osso de suporte (Heitz-Mayfield & Salvi, 2018; Schwarz et al., 2018).

Contrariamente à doença, a saúde peri-implantar é determinada pela ausência de eritema, hemorragia à sondagem, edema, supuração e perda óssea que não seja fisiológica (Araujo & Lindhe, 2018; Berglundh et al., 2018).

1.2 Características Clínicas da Peri-Implantite

Entre as principais características clínicas numa localização afetada por peri-implantite devem-se destacar, os sinais de inflamação, incluindo rubor e edema, hemorragia à sondagem, com ou sem supuração, aumento da profundidade de sondagem e/ou recessão da margem gengival, juntamente com perda óssea radiográfica, quando comparada com registos prévios. Na ausência de registos, o diagnóstico é realizado com base nas seguintes premissas: presença de hemorragia à sondagem e/ou supuração à sondagem suave; profundidades de sondagem maiores, ou iguais a 6 mm e níveis ósseos com valores de 3 mm ou mais para apical, da porção mais coronal da parte intraóssea do implante (Berglundh et al., 2018; Schwarz et al., 2018).

No sentido de fazerem um acompanhamento da reabilitação protética é recomendado que os clínicos obtenham medições iniciais da perda óssea radiográfica e profundidades de sondagem. Posteriormente, uma nova radiografia deve ser realizada para que seja estabelecido um nível ósseo de referência após remodelação fisiológica (Berglundh et al., 2018).

De acordo com Ramanauskaite et al. (2018) observa-se uma correlação positiva entre a severidade da doença com os parâmetros clínicos referidos. No que diz respeito aos valores de HS, verifica-se um aumento significativo deste parâmetro clínico em implantes diagnosticados com PI (86% ao nível do implante). Quando analisadas as médias relativas à PS entre localizações saudáveis e afetadas, as mesmas evidenciam diferenças igualmente relevantes (saudável: 2,95 mm; peri-implantite: 4,91 mm). Após confirmação da associação entre PS aumentadas com o estado de doença, Schwarz et al. (2017) verificaram uma frequência ainda maior de medições entre os 4 e os 6 mm em localizações não saudáveis. Relativamente à supuração, inúmeros autores indicaram a sua presença nas localizações afetadas por PI (Lang et al., 2011; Lindhe et al., 2008).

1.3 Características Histopatológicas da Peri-Implantite

Histologicamente, a mucosa peri-implantar saudável forma uma barreira ao aderir ao implante e, em contraste com o periodonto, apresenta fibras de colagénio paralelas à superfície do mesmo (Berglundh et al., 1991). A disposição das fibras, apesar de transmitirem fragilidade, comparativamente ao tecido conjuntivo nos dentes naturais, proporciona, pelo contrário, o mesmo tipo de aderência e potencial na prevenção da formação de placa bacteriana (Kormas et al., 2020).

As lesões peri-implantares têm sido extensivamente avaliadas através de biópsias humanas. Importante será referir as suas características principais, entre as quais, a extensão para apical do epitélio juncional, número e densidade aumentada dos seus constituintes, principalmente macrófagos e neutrófilos, tal como um aumento da densidade de estruturas vasculares externas e laterais ao infiltrado celular (Berglundh et al., 2018; Carcuac & Berglundh, 2014).

Têm sido conduzidos diversos estudos com o objetivo de clarificar a diferença entre o padrão de progressão da peri-implantite e da periodontite, que apesar de bastante similares apresentam, ainda assim, as suas diferenças (Kormas et al., 2020). Nas localizações afetadas pela periodontite, entre o infiltrado celular inflamatório e a crista óssea alveolar, encontra-se o tecido conjuntivo supra-alveolar não inflamado; ao passo que na peri-implantite este é substituído por um volume aumentado de infiltrado celular que se estende até ao osso alveolar (Kormas et al., 2020). Na sua composição, assim como nas lesões periodontais, o infiltrado contém células plasmáticas. Contudo, a mesma é caracterizada sobretudo pelo aumento da proporção de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares presentes nos compartimentos perivasculares (Schwarz et al., 2018).

1.4 Características Microbiológicas da Peri-Implantite

Atualmente, existem evidências de estudos observacionais em como a placa bacteriana representa o principal fator etiológico para o desenvolvimento de PI (Berglundh et al., 2018; Javed et al., 2011).

Imediatamente após a inserção do implante é formada uma película salivar em torno das superfícies expostas ao meio oral, o que possibilita a adesão de colonizadores bacterianos iniciais, fornecendo assim, uma superfície recetora para adesão de futuros

colonizadores (Kolenbrander et al., 2010). Numa fase mais tardia, as comunidades bacterianas que colonizam o nicho peri-implantar atingem um equilíbrio simbiótico com o hospedeiro, compatível com saúde peri-implantar (Belibasakis & Manoil, 2021). Todavia, ocorrem ocasionalmente modificações resultantes do microambiente, que por sua vez resultam em disbiose exacerbando a progressão inflamatória (Heitz-Mayfield & Lang, 2010).

Com o objetivo de identificar as bactérias associadas a infecções peri-implantares têm sido utilizadas as técnicas em cultura anaeróbia e observação em microscopia de contraste de fase (Charalampakis & Belibasakis, 2015). Desta forma, é possível referir as bactérias anaeróbias gram-negativo e móveis, como sendo as espécies que surgem maioritariamente na PI (Belibasakis & Manoil, 2021).

Em comparação às localizações saudáveis, as localizações afetadas pela peri-implantite apresentam maior diversidade de bactérias, mais precisamente de 19 espécies, incluindo membros do “complexo vermelho”, comumente envolvidos na periodontopatogénese, tais como, a *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (Belibasakis et al., 2016; Persson & Renvert, 2014; Shibli et al., 2008). De um modo geral, os estudos verificaram semelhanças entre as infecções peri-implantares e a gengivite ou periodontite crónica (Belibasakis & Manoil, 2021). No entanto, observam-se algumas diferenças relacionadas com a presença de patógenos oportunistas de origem bacteriana, (por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), fúngica (por exemplo: *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Penicillium spp.*, *Rhadorula laryngis*, *Paelicomycetes spp*) e viral (por exemplo: *Cytomegalovirus* humano, vírus *Epstein-Barr*), o que aponta para uma infeção heterogénea complexa (Kormas et al., 2020; Persson & Renvert, 2014; Schwarz et al., 2018).

Essencialmente a peri-implantite continua a ser considerada uma infeção mista endógena, implicando, ocasionalmente, bactérias orais atípicas (Belibasakis & Manoil, 2021).

1.5 Fatores e Indicadores de Risco

São considerados fatores de risco os agentes que aumentam a probabilidade de ocorrência da doença, sendo geralmente confirmados por estudos longitudinais. Em contrapartida, os indicadores de risco são justificados com base em estudos transversais (Beck, 1998). O seu conhecimento revela-se importante, uma vez que permite identificar pacientes que apresentam um maior risco de desenvolvimento de uma resposta osteoimunoinflamatória acentuada, quando expostos aos agentes patogénicos da PI (Côrrea et al., 2019).

Entre os fatores de risco que têm sido associados a esta patologia destacam-se o tabagismo e a diabetes *mellitus*. Todavia, uma revisão de literatura submetida para o *Workshop* Mundial de 2017, relatou uma discordância e inconclusividade entre alguns dos estudos incluídos, os quais não conseguiram identificar nem o tabagismo nem a diabetes como fatores de risco para a PI (Schwarz et al., 2018). Schwarz et al. (2018) confirmaram ainda a necessidade de desenvolver estudos adicionais que avaliassem estas possíveis associações, com o intuito de alcançar uma robustez maior na evidência apresentada.

Mais tarde, segundo os estudos de Kormas et al. (2020) e Maney et al. (2020), o tabagismo foi considerado um fator de risco relevante para a peri-implantite e tem sido altamente relacionado com o aumento da prevalência desta condição, induzindo negativamente a perda óssea implantar e consequente falha do implante (Kormas et al., 2020; Maney et al., 2020). Por outro lado, de acordo com Kormas et al. (2020) a diabetes *mellitus* é considerada uma doença sistémica pró-inflamatória, na qual a resposta imune do hospedeiro é alterada, afetando as vias anabólica e catabólica da cicatrização óssea, que resulta no aumento da osteoclastogénese e comprometimento da atividade dos osteoblastos. Assim, é conhecida por poder afetar a osteointegração e o sucesso dos implantes.

A literatura atual tem reforçado a influência de outros fatores de risco, previamente estabelecidos, para a peri-implantite, tais como, uma higiene oral deficiente, ausência de manutenção regular, histórico de periodontite, e má qualidade do tecido mole peri-implantar. Pode-se ainda referir a medicação, idade, género, níveis de vitamina D e doenças auto-imunes, como indicadores no estabelecimento da PI, todavia investigações futuras são precisas para confirmar a sua associação (Maney et al. 2020).

Por outro lado, determinadas evidências indicam a eventual influência de vários polimorfismos genéticos e consequentemente a suscetibilidade de certos indivíduos para esta condição (Schwarz et al., 2018).

1.6 Prevalência

Como referido anteriormente, a colocação cirúrgica de implantes dentários constitui, cada vez mais, uma das principais opções de reabilitação oral, estabelecendo assim, uma correlação positiva com a prevalência das doenças associadas, como a peri-implantite (Alassy et al., 2019).

Com objetivo de alcançar um melhor entendimento sobre a prevalência da PI foram realizadas duas meta-análises, nas quais os valores estimados para a prevalência desta patologia a nível dos implantes e dos pacientes são de 9,6% e de 18,8%, respetivamente (Atieh et al., 2013).

Por outro lado, Derks & Tomasi (2015) apresentam resultados que rondam valores entre 1 e 47%, sendo a média ponderada de 22% (a nível do paciente). A discrepância entre o valor máximo e o valor mínimo da prevalência deve-se ao facto de os estudos incluídos apresentarem limitações na aleatoriedade da amostragem e seleção dos pacientes. Segundo os autores, os estudos também deveriam incluir pacientes tratados em diversos contextos clínicos, bem como amostras maiores (Derks & Tomasi, 2015).

Além disso, apesar da definição de peri-implantite ter sido aplicada de igual modo em todos os estudos, os limiares de perda óssea estipulados para as definições de caso de doença variaram significativamente, com implicações nos resultados das prevalências obtidas (Albrektsson & Isidor, 1994; Derks & Tomasi, 2015; Zitzmann & Berglundh, 2008).

De acordo com um estudo de Zetterqvist et al. (2010) que estabeleceu 5 mm como limiar máximo para a perda óssea, a prevalência da peri-implantite reportou valores mínimos de 1%, enquanto Koldslund et al. (2010) que utilizou como limiar 0,4 mm obteve valores máximos de 47%.

Em virtude da necessidade de um consenso relativo ao que é tido como limiar de perda óssea considerada patológica, de maneira a facilitar comparações em estudos epidemiológicos, foram determinadas definições de caso no 8º *Workshop* Europeu de Periodontologia. Na condição de não existirem radiografias prévias, uma perda óssea

superior a 2mm, juntamente com a presença de inflamação clínica, foi considerado como o limiar para definir PI (Sanz & Chapple 2012).

Recentemente, ao serem aplicados critérios mais estritos que os anteriores, nos quais o requisito para se considerar perda óssea não fisiológica foi 1 mm superior ao estabelecido previamente, verificou-se uma diminuição significativa na prevalência da peri-implantite (6,5% a nível do paciente e 3,4% a nível do implante) (Shimchuk et al., 2020).

Em conclusão, estudos futuros sobre a epidemiologia da PI devem considerar vários aspetos, nomeadamente as definições de caso sugeridas, aleatoriedade relativamente à seleção de pacientes, prevalência, extensão e severidade das diferentes entidades da doença (Derks & Tomasi, 2015; Sanz & Chapple, 2012; Zitzmann & Berglundh, 2018).

2. Fluido Crevicular Gengival e Fluido Crevicular Peri-Implantar

Em meados do século passado, investigadores dedicaram-se a estudar a anatomia e fisiologia do sulco, com o objetivo de determinar a composição e função do fluido gengival (Bostanci et al., 2007; Ganowicz, 2011; Miller et al., 2010). Ainda nessa altura, em 1960, foi proposta a análise do fluido crevicular gengival (FCG) para obtenção quantitativa do estado inflamatório dos tecidos periodontais (Brill, 1960). Desde então, o interesse no potencial do FCG para o diagnóstico tem vindo a aumentar e continua, no decorrer dos anos, a ser um tópico de estudo relevante (Bevilacqua et al., 2016).

No entanto, apesar da importância do FCG ter vindo a ser reconhecida nas últimas décadas, a sua origem e função constituem um tema controverso. Isto deve-se à discordância entre estudos, relativamente à questão sobre a origem fisiológica, ou patológica do fluido, o que resulta numa discrepância na sua caracterização face às diferentes definições atribuídas pelos vários autores (Barros et al., 2016).

Originalmente, a maioria dos investigadores definiam o FCG como um exsudado inflamatório (Cimasoni, 1974). Contudo, outras evidências indicaram que o FCG proveniente de tecido clinicamente saudável constitui um transudado sérico, cuja alteração para um exsudado inflamatório só ocorre na presença clínica de doença (Weinstein et al., 1967). Recentemente, esta afirmação foi refutada tendo em conta a

descoberta da migração dos neutrófilos para o sulco mesmo em condições de saúde. Tal facto, tende a ofuscar a caracterização do FCG como um exsudado inflamatório *versus* um transudado fisiológico (Barros et al., 2016). Assim, segundo a maioria dos autores o FCG é considerado um fluido fisiológico e um exsudado inflamatório, formado no plexo dentogengival, localizado no tecido conjuntivo, subjacente ao epitélio de revestimento do espaço dento-gengival (Alassy et al., 2019; Barros et al., 2016).

Segundo Khurshid et al. (2017), o FCG é constituído, essencialmente, por componentes celulares, iões orgânicos, iões inorgânicos, enzimas e produtos bacterianos. No que diz respeito às células do sistema imunológico do FCG, 91 a 97% são neutrófilos e outros leucócitos polimorfonucleares, que prevalecem quantitativamente entre todos os leucócitos presentes no fluido. Apenas 2 a 3% são monócitos/macrófagos e 1 a 6% linfócitos, dos quais 29% linfócitos T e 71% linfócitos B (Rahnama et al., 2014).

No decorrer do estado inflamatório, a composição do FCG modifica-se e, segundo alguns investigadores, os níveis de proteínas obtidos a partir das localizações afetadas aumenta bastante, apresentando valores similares às concentrações de proteínas no soro sanguíneo (Ganowicz, 2011; Miller et al., 2010). Em concordância, Barros et al. (2016) e Rahnama et al. (2014) confirmaram a libertação de inúmeras células e mediadores inflamatórios no FCG, tais como citoquinas, proteinases e fosfatases, durante a inflamação (Tabela 2). Deste modo, a sua composição poderá ser utilizada com o propósito de detetar mudanças subclínicas no metabolismo tecidular, recrutamento de células inflamatórias e remodelação do tecido conjuntivo (Alassy et al., 2019).

A homeostase dos tecidos é mantida através da microcirculação de nutrientes e de metabolitos entre o sangue e os tecidos, sendo a pressão resultante do fluído intersticial definida como pressão osmótica (PO). Consequentemente, o aumento da pressão vascular numa fase inicial da inflamação pode ser considerado um fator para o aumento da PO. Este fenómeno ocorre igualmente nos tecidos gengivais e na pressão osmótica gengival (POG). Assim, sempre que a POG aumenta, devido à inflamação causada pela deposição de placa bacteriana e consequente aumento da pressão dos vasos sanguíneos subepiteliais, dá-se a saída do FCG para o sulco gengival (Barros et al., 2016; Sakallıoğlu et al., 2011). Por conseguinte, até alcançar o sulco gengival o FCG passa pela membrana externa basal e pelo epitélio juncional (Alassy et al., 2019).

Tabela 1. Mediadores inflamatórios libertados no fluido crevicular gengival na inflamação. Adaptado de (Rahnama et al., 2014).

Mediadores da resposta imunitária	Grupos totais e subgrupos de imunoglobulina IgG Derivados do ácido araquidónico – PGE2 Citoquinas – IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α	
Enzimas e Inibidores de Enzimas	Enzimas proteolíticas	Collagenase Elastase Cathepsina-B Cathepsina-G Cathepsina-D Triptase
	Enzimas hidrolíticas	Arilsulfatase β -glucuronidase Fosfatase alcalina Fosfatase ácida Mieloperoxidase Lactoferrina Lisozima
Proteínas específicas do osso	Osteonectina Fosfoproteína (N-propeptídeo) Osteocalcina Telopectídeo do colagénio tipo I Produtos de degradação tecidual	
Componentes	Fibronectina Colagénio Proteoglicanos Glicosaminoglicanos	
Produtos de degradação	Componentes divididos da fibronectina Hidroxiprolina	
Péptidos finais	Glicosaminoglicanos Condroitina-4-sulfato Sulfato de condroitina-6	

O fluido crevicular peri-implantar é considerado um exsudato inflamatório mediado osmoticamente. A sua composição, semelhante à do fluido crevicular gengival, é rica em biomarcadores úteis no diagnóstico de uma doença, por serem considerados

indicadores mensuráveis da severidade da mesma, ou da sua progressão (Li & Wang, 2014; Strimbu & Tavel, 2010). No estágio inicial da doença peri-implantar, ainda que clinicamente latente, o volume do FCPI e a expressão dos seus biomarcadores aumentam como resposta à inflamação dos tecidos (Wang et al., 2016). Além disso, são também registados níveis de fluxo mais elevados do FCPI, consoante a severidade da inflamação gengival (Bevilacqua et al., 2016).

3. Biomarcadores no Fluido Crevicular Peri-Implantar

Como referido anteriormente, as radiografias e os parâmetros clínicos, como a profundidade de sondagem, a hemorragia à sondagem e o nível de inserção clínico, são utilizados para diagnosticar a peri-implantite. Porém, algumas das investigações publicadas sobre biomarcadores revelam a sua utilidade perante o diagnóstico e o entendimento da patogénese de determinadas doenças (Li & Wang, 2014). Um biomarcador, ou marcador biológico, é considerado “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica” (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Entre as principais vantagens dos biomarcadores, deve-se mencionar a repetibilidade e a natureza não invasiva na recolha das amostras (Dursun & Tözüm, 2016).

Relativamente aos biomarcadores mais estudados no fluido crevicular peri-implantar devem-se salientar: os mediadores inflamatórios, entre eles, a PGE2, as citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , o TNF- α , a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-12 (IL-12), a interleucina-17 (IL-17), a interleucina-8 (IL-8) e a interleucina-23 (IL-23), além das citocinas anti-inflamatórias, nomeadamente a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10); os marcadores ósseos, tal como o ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), o recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e a osteoprotegerina (OPG); e as enzimas, sobretudo a metaloproteinase de matriz 1 (MMP1), a metaloproteinase de matriz 8 (MMP8), a metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) e a metaloproteinase de matriz 13 (MMP13) (Alassy et al., 2019).

De seguida, irão ser aprofundadas as principais ações pró-inflamatórias dos biomarcadores de estudo desta revisão narrativa, os mediadores inflamatórios IL-1 β , TNF- α e PGE2 e, posteriormente, a sua relação com a peri-implantite.

4. Papel Pró-Inflamatório dos Mediadores: IL-1 β , TNF- α e PGE2

4.1 Citoquinas Pró-Inflamatórias: IL-1 β e TNF- α

A infecção bacteriana da peri-implantite promove a resposta imunológica e bioquímica dos tecidos do hospedeiro e resulta na libertação de diversas citocinas (Bharadwaj & Varghese, 2018). Assim, estes mediadores solúveis das reações imunes, presentes no FCPI, são produzidos como resultado da interação fisiológica do epitélio gengival e leucócitos locais com a placa bacteriana e microbiota oral. Na periodontologia e na implantologia o efeito das citocinas é crucial na homeostase dos tecidos, por meio da alteração e reparação que promovem em situações de inflamação (Petković et al., 2010).

As citocinas pró-inflamatórias são proteínas secretadas pelas células de imunidade inata (principalmente neutrófilos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (principalmente linfócitos) envolvidas na progressão da peri-implantite e das condições periodontais, sendo consideradas biomarcadores deste processo (Nowzari et al., 2012; Vieira et al., 2013; Xiao et al., 2016).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são leucócitos recrutados dos vasos sanguíneos periféricos por fatores quimiotáticos, mais especificamente por quimiocinas e predominam na resposta inflamatória aguda inicial. Estes são responsáveis por produzir inúmeras citocinas, tais como a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6 (Graves et al., 2011). Por outro lado, os macrófagos são produzidos a partir da diferenciação dos monócitos nos tecidos. Os monócitos/macrófagos podem ter um fenótipo inflamatório ou de provascularização, conhecidos como M1 e M2, sendo os macrófagos M1 responsáveis pela produção de citocinas, como a IL-1 β , o TNF- α e o RANKL, enquanto os macrófagos M2 produzem mediadores anti-inflamatórios, por exemplo, a IL-10 e a IL-4 (Benoit et al., 2008).

As principais células da imunidade adaptativa são os linfócitos B e T. Os linfócitos B apresentam um papel na expressão do TNF- α , da IL-6 e do RANKL, estimulando a osteoclastogénese. Em contrapartida, os linfócitos T podem-se converter em células T auxiliares 1 (Th1), células T auxiliares 2 (Th2) e células T auxiliares 17 (Th17), as quais regulam a reabsorção óssea. As células do tipo Th1 produzem a interleucina-1 (IL-1) e o TNF- α (Sato et al., 2006).

A superfamília IL-1 constitui um grupo de 11 citocinas, que perante uma infecção são essenciais nas respostas imunes e reações inflamatórias agudas e crónicas do hospedeiro, estando também por isso associadas a inflamações como a periodontite e a peri-implantite (Bharadwaj & Varghese, 2018). Ambas as isoformas do IL-1, a IL-1 β e a IL-1 α , têm ações pró-inflamatórias capazes estimular a produção de outras citocinas e prostaglandinas e de induzirem a expressão do RANKL e produção de enzimas de degradação tecidual (Xiao et al., 2016).

A IL-1 β é secretada localmente em resposta à infecção periodontal e peri-implantar e como mencionado anteriormente, os macrófagos e os neutrófilos são, entre outras células, os responsáveis pela produção desta citocina (Casado et al., 2013; Tatli et al., 2013).

Assim, destacam-se como principais funções da IL-1 β , o controlo, não só da degradação dos componentes da matriz extracelular pelo sistema ativador do plasminogénio no decorrer da inflamação, como também da cicatrização de feridas e da produção da PGE2, que também desempenha um papel importante na degradação dos tecidos duros (Casado et al., 2013; Faot et al., 2015).

Contudo, os efeitos biológicos da IL-1 β dependem da sua concentração nos tecidos (Petković et al., 2010). Uma vez inibida a IL-1 β , verifica-se uma redução na progressão da inflamação tecidual e na destruição dos tecidos (Delima & Van Dyke, 2003).

O TNF- α é considerado uma citocina pró-inflamatória com propriedades semelhantes à IL-1 β , fulcral na patogénese da PI. Além disso, é também o principal mediador na resposta a bactérias gram-negativo e a sua concentração reflete a quantidade de bactérias presentes no estado inflamatório da doença (Graves & Cochran, 2003; Petković et al., 2010).

Relativamente à sua origem, o TNF- α é produzido sobretudo por macrófagos ativados e por outros tipos de células, como linfócitos T ativados, neutrófilos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e células de revestimento ósseo, incluindo osteoblastos (Xiao et al., 2016).

A expressão do TNF- α promove a osteoclastogénese, através do aumento da expressão do recetor do fator estimulador de colónias-1 (recetor CSF-1), bem como da indução dos mecanismos de sinalização do RANKL, responsáveis por ativar os osteoclastos. Adicionalmente, o TNF- α estimula os precursores dos osteoclastos e as células do estroma para produzirem citocinas osteoclastogénicas, tais como a IL-1, o

RANKL e o fator estimulador de colónias de macrófagos humano (M-CSF) (Xiao et al., 2016).

Contudo, surge um conflito sobre a possível indução da osteoclastogénese a partir do TNF- α , independentemente da ação do RANKL. Schett (2011) afirma que é provável que o TNF- α propicie um aumento sinérgico da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, apenas ao interagir com o RANKL. Todavia, Xiao et al. (2016) defendem que o TNF- α é capaz de induzir o RANKL e estimular a osteoclastogénese diretamente e independentemente do RANKL.

Por outro lado, o TNF- α inibe a diferenciação das células precursoras em novos osteoblastos e o papel dos osteoblastos na formação óssea (Xiao et al., 2016).

Além de promover a reabsorção óssea, Schett (2011) salienta o papel fundamental do TNF- α na inflamação, através da ativação da expressão de citocinas, quimiocinas e da molécula de adesão celular endotelial. O TNF- α estimula ainda a apoptose de fibroblastos, o que resulta numa limitação da reparação do periodonto e aumenta também a secreção local e a atividade das metaloproteinases, que degradam o tecido conjuntivo. Esta citocina atua também na promoção da angiogénese, na inibição da atividade de células T reguladoras e, por fim, na sensibilização à dor (Boyce et al., 2005; Faot et al., 2015; Tatli et al., 2013).

Tendo em consideração as funções referidas anteriormente e devido à atuação sinérgica do TNF- α e da IL-1 β são desencadeados diversos mecanismos envolvidos na degradação dos tecidos peri-implantares, como esquematizado na figura 1 (Duarte et al., 2009; Graves & Cochran, 2003; Petković et al., 2010).

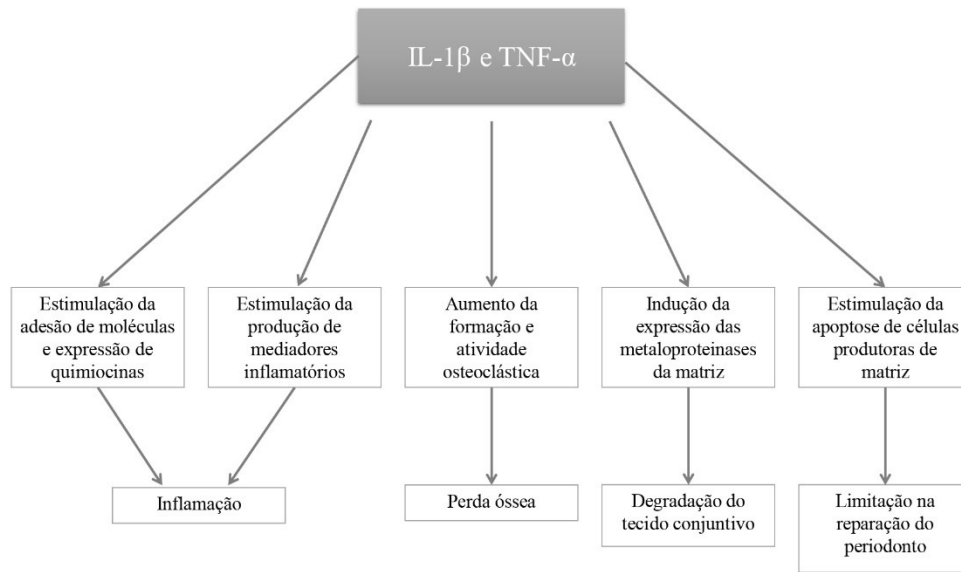


Figura 1: Mecanismos envolvidos na degradação dos tecidos peri-implantares, desencadeados pela IL-1 β e TNF- α . Adaptado de (Graves & Cochran, 2003).

4.2 Prostaglandina E2

A prostaglandina E2 é um metabolito do ácido araquidónico que apresenta diversos efeitos pró-inflamatórios nos tecidos peri-implantares e periodontais (Yalçın et al., 2005). A produção deste mediador inflamatório é atribuída a diferentes tipos de células, principalmente macrófagos, mas também fibroblastos e células epiteliais gengivais (Alkan et al., 2016; Båge et al., 2011).

De acordo com Nasry et al. (2018) ao ligar-se a um dos seus quatro recetores (EP1, EP2, EP3 e EP4) a PGE2 desencadeia processos fisiológicos relacionados com a resposta imune do hospedeiro e com a pressão sanguínea. Deste modo, como descrito por Alkan et al. (2016), Basegmez et al. (2012) e Tatli et al. (2013) a PGE2 funciona como um vasodilatador que intensifica a permeabilidade vascular em locais de inflamação, para além de contribuir para a libertação de colagénio, ativação de osteoclastos e mediação da reabsorção óssea.

Por outro lado, ao promover a angiogénese contribui para o processo de cicatrização na inflamação crónica (Nasry et al., 2018).

Todavia, Minamizaki et al. (2009) defende que apesar da PGE2 promover a formação de osteoclastos por intermédio do RANKL, pode também possuir um efeito na

osteogénese por si própria, sem intermediários. Esta afirmação pode ser confirmada face à evidência existente acerca dos mecanismos moleculares subjacentes às ações da PGE2 na formação óssea, nomeadamente o fator-2 transcrição *Runt-related* (Runx2) e o fator de transformação do crescimento beta tipo III (TGF- β tipo III), cruciais para o desenvolvimento e função dos osteoblastos (Minamizaki et al., 2009).

5. Associação Entre os Níveis de IL-1 β , TNF- α e PGE2 e a Peri-implantite

Os investigadores e os profissionais clínicos procuram, continuamente, encontrar métodos e técnicas que auxiliem na realização de um diagnóstico precoce da PI. Desta forma, a medição dos níveis dos biomarcadores tem vindo a despertar interesse como potencial ferramenta para a deteção precoce desta doença (Dursun & Tözüm, 2016).

Como tal, serão apresentados neste capítulo diversos estudos, incluindo investigações, revisões narrativas, revisões sistemáticas e meta-análises que analisam esta temática e procuram uma associação entre as concentrações da IL-1 β , TNF- α e PGE2 com o estabelecimento da doença peri-implantar.

A maioria das revisões sistemáticas e meta-análises destacam o papel das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , comparativamente a outros biomarcadores, no diagnóstico precoce da PI (Alassy et al., 2019; Dursun & Tözüm, 2016). Tal facto deve-se às diferenças estatísticas significativas observadas ao comparar as concentrações destes mediadores inflamatórios no FCPI de localizações afetadas pela doença, em comparação a localizações saudáveis (Duarte et al., 2009).

Zani et al. (2016) desenvolveram uma investigação, cuja abordagem compreende a utilização de múltiplos biomarcadores para avaliar a capacidade destes analitos do FCPI em diferenciarem saúde de doença peri-implantar. Consequentemente, foi aplicada uma regressão logística para determinar o modelo de biomarcadores que revela propriedades de diagnóstico superiores, em comparação com os biomarcadores isolados. Esse modelo consiste na combinação de seis biomarcadores, entre eles o TNF- α . Este estudo comprovou ainda que as localizações diagnosticadas com PI exibem níveis mais elevados de IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17. Porém, menciona a existência de outros estudos que contradizem a alteração na concentração da IL-1 β nas localizações doentes, comparativamente às saudáveis.

O estudo transversal realizado por Gürlek et al. (2017) analisou os níveis das citocinas no FCPI, no FCG e amostras de placa bacteriana submucosa/subgengival de localizações clinicamente saudáveis e doentes nos mesmos indivíduos. Relativamente aos níveis da IL-1 β , estes são significativamente mais baixos em situações de saúde, contrariamente à PI e MPI. Por outro lado, ao comparar implantes dentários com os dentes naturais com estados de saúde semelhantes, foram registadas concentrações de IL-1 β mais elevadas no grupo dos implantes dentários saudáveis, ao invés dos dentes naturais.

Os resultados de uma investigação publicada em 2016, sugerem que os níveis mais elevados de biomarcadores (IL-1 β) no FCPI de áreas de inflamação tecidular, de regulação/degradação da matriz e de reabsorção óssea, combinados com perfis microbianos específicos, apresentam potencial quanto à previsão da PI (Wang et al., 2016).

Todavia, Hultin et al. (2002) não reportaram nenhuma diferença estatisticamente significativa, relativamente aos níveis da IL-1 β nas localizações afetadas e não afetadas pela PI.

Conforme a revisão narrativa de Alassy et al. (2019), a avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no FCPI pode ser relevante no diagnóstico da peri-implantite e da mucosite peri-implantar. Ainda assim, são necessários mais ensaios clínicos longitudinais controlados para estudar o papel destas citocinas na previsão da progressão da PI.

Os resultados de uma revisão sistemática realizada por Duarte et al. (2016) apresentaram níveis de evidência moderados relativamente à associação entre concentrações elevadas das citocinas pró-inflamatórias no FCPI e a PI. Por outro lado, a evidência é limitada no que diz respeito às concentrações de outros biomarcadores, nomeadamente citocinas anti-inflamatórias, citocinas relacionadas com a osteoclastogénese e quimiocinas, como possíveis indicadores da PI.

Javed et al. (2011), numa revisão sistemática, defendem que níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias são evidenciados no FCPI de pacientes com PI. Como resultado, a monitorização das concentrações das citocinas possibilita a deteção precoce das condições inflamatórias, mesmo que não sejam ainda clinicamente detetáveis. Em concordância, 4 e 6 estudos, dos 15 analisados nesta revisão, validaram a associação entre a IL-1 β e o TNF- α , respetivamente, com a PI.

Em concordância, Dursun & Tözüm (2016) comprovaram, através de uma revisão sistemática descritiva, que a IL-1 β e o TNF- α são, atualmente, as citocinas pró-

inflamatórias mais promissoras no que concerne à sua utilização como biomarcadores no FCPI para diferenciação entre a PI e saúde. Entre os 19 estudos avaliados, 13 e 7 estudos confirmaram a relação da IL-1 β e do TNF- α , respetivamente, com a inflamação peri-implantar. Em oposição, outros 3 estudos não verificaram nenhuma associação entre o TNF- α e a PI e 5 deles não constatarem diferenças significativa entre os grupos saudáveis e doentes.

Nesta circunstância, uma meta análise refere que, tanto o TNF- α , como a IL-1 β , existentes no fluido crevicular de bolsas peri-implantares, podem ser utilizados com o objetivo de diagnosticar precocemente a PI. Entre os 19 estudos abrangidos, todos demonstraram que os valores das citocinas pró-inflamatórias no FCPI, com destaque para a IL-1 β e o TNF- α , aumentaram nas localizações afetadas pela MPI e PI, em relação às localizações saudáveis. No entanto, após a instalação do processo inflamatório, não são detetadas diferenças significativas entre as concentrações das citocinas na PI e na MPI. Por conseguinte, a terapia peri-implantar deve ser iniciada num estágio precoce da progressão da doença, com o intuito de modular a resposta imunitária do hospedeiro (Faot et al., 2015).

O papel desempenhado pela PGE2 na reabsorção óssea mediada por osteoclastos tem vindo a despertar o interesse de vários investigadores, que desenvolveram estudos retrospectivos e transversais com o objetivo de pesquisar a associação deste mediador com os parâmetros clínicos de tecidos peri-implantares saudáveis e de implantes que aparentam sinais de doença peri-implantar (Basegmez et al., 2012; Tatli et al., 2013).

No que diz respeito à PGE2, os primeiros estudos que avaliaram a associação entre as concentrações deste mediador inflamatório com a PI remontam ao século passado. Porém, enquanto o estudo de Salcetti et al. (1997) detetou uma associação entre os níveis elevados de PGE2 e uma maior frequência de *P. nigrescens* e *P. micros*, fornecendo um método de diagnóstico adicional nos implantes com PI, o estudo de Aboyoussef et al. (1998) reportou que as concentrações de PGE2 não diferiam significativamente entre as localizações saudáveis e afetadas pela PI.

Mais tarde, Yalçın et al. (2005) consideram a possibilidade da utilização de testes bioquímicos, particularmente a deteção dos níveis de PGE2 no FCPI ser considerado um meio de diagnóstico adequado para o controle de implantes funcionais. Ainda assim, sendo esta investigação um estudo transversal, é necessário um maior número de estudos longitudinais para confirmar a relevância dos níveis de PGE2 na deteção da destruição óssea e tecidual em redor dos implantes. Adicionalmente, este estudo apresenta algumas

limitações, entre as quais, uma amostra pequena e um número limitado de casos que apresentem bolsas profundas.

Numa investigação de Ketabi et al. (2017) foram analisados simultaneamente quatro biomarcadores no FCG e no FCPI de 41 pacientes em 4 grupos diferentes (dentes saudáveis, implantes saudáveis, periodontite e peri-implantite) durante um período de 6 meses. De acordo com os resultados do estudo, a PGE2 registou níveis mais elevados no FCPI do grupo com PI, em comparação com o FCPI de implantes saudáveis.

Num estudo prospetivo de Basegmez et al. (2012) foram comparados os níveis de PGE2 e de MMP-8 no FCPI após a osteointegração e reabilitação dos implantes com próteses fixas ou parciais. Após o 12º mês observou-se um aumento do nível de PGE2, sendo que este atingiu o seu pico ao 18º mês. Por fim, concluiu-se que a deteção de PGE2 e MMP-8 no FCPI podem ser úteis para monitorizar a progressão da doença peri-implantar.

Segundo Dursun & Tözüm (2016), embora um dos estudos incluídos na revisão sistemática revele a correlação positiva entre o índice gengival e as PS com a PGE2, dois outros estudos não reportaram diferenças entre a PI e a saúde peri-implantar, no que se refere às concentrações do biomarcador no FCPI.

De acordo com a evidência apresentada pode-se concluir que apesar de determinados estudos não encontrarem relação entre a IL-1 β , TNF- α , PGE2 e a peri-implantite, a sua maioria, como é evidenciado nas revisões sistemáticas referenciadas, demonstra uma associação positiva entre as concentrações elevadas destes biomarcadores no FCPI de localizações doentes *versus* saudáveis. A tabela 2 sintetiza a evidência apresentada acerca da associação entre a IL-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Sabrina Rebollo Zani, Kevin Moss, Jamil Awad Shibli, Eduardo Rolim Teixeira, Renata de Oliveira Mairink, Tatiana Onuma, Magda Feres, Ricardo Palmier Teles.	2016	“Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease” (Estudo transversal)	- Examinar o potencial dos analitos do FCPI como indicadores de saúde e de doença, recorrendo a uma abordagem multi- biomarcadores.	- Foram registadas diferenças estatísticas significativas entre as localizações saudáveis de implantes saudáveis e as localizações afetadas dos implantes doentes em 12 dos 20 biomarcadores.	- Os biomarcadores do FCPI podem auxiliar na distinção entre saúde peri-implantar e doença peri-implantar. - Uma abordagem multi- biomarcadores, que inclua a IL-17, IL-1-ra, Flt-3L, IL-10, sCD40L, GM-CSF, TNFa, PDGF-BB e IL-15, pode ter potencial no diagnóstico de implantes com PI.
Önder Gürlek, Pınar Gümüş, Christopher J. Nile, David F. Lappin, Nurcan Buduneli	2017	“Biomarkers and Bacteria Around Implants and Natural Teeth in the Same Individuals” (Estudo transversal)	- Analisar os níveis das citoquinas no FCPI, no FCG e amostras de placa bacteriana submucosa/subgengival de localizações cl clinicamente saudáveis e doentes nos mesmos indivíduos.	- Os níveis de IL-1 β são significativamente mais baixos em situações de saúde, contrariamente à PI e MPI. - Foram registadas concentrações de IL-1 β mais elevadas no grupo dos implantes dentários saudáveis, ao invés dos dentes naturais.	- Verificaram-se semelhanças, apesar de algumas diferenças, nos níveis de biomarcadores (IL-1 β e sRANKL) e nas espécies bacterianas entre as localizações com peri- implantite e as localizações com periodontite nos mesmos indivíduos, sugerindo assim mecanismos patogénicos semelhantes.

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Hom-Lay Wang, Carlos Garaicoa-Pazmino, Amy Collins, Hwen-Sei Ong, Rini Chudri, William V. Giannobile.	2016	“Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis” (Estudo transversal)	- Determinar o perfil dos biomarcadores do FCPI combinado com perfis microbianos de implantes saudáveis e de implantes com peri-implantite, para avaliar a atividade da doença em tempo real.	- A concentração média de IL-1 β é mais elevada nos pacientes com PI. - A <i>T. denticola</i> juntamente com as concentrações de IL-1 β potencia a capacidade de diagnóstico para a PI.	- Os níveis elevados de IL-1 β no FCPI de áreas de inflamação tecidual, de regulação/degradação da matriz e de reabsorção óssea, combinados com perfis microbianos específicos, apresentam potencial quanto à previsão da PI.
Margareta Hultin, Anders Gustafsson, Hadar Hallström, L-Å. Johansson, Anders Ekfeldt, Björn Klinge.	2002	“Microbiological findings and host response in patients with periimplantitis” (Estudo longitudinal)	- Caracterizar a microbiota e a resposta inflamatória do hospedeiro em redor dos implantes e dentes nos pacientes com peri-implantite.	- Não foi reportada nenhuma diferença estatisticamente significativa, relativamente aos níveis da IL-1 β nas localizações afetadas e não afetadas pela PI.	- As concentrações de IL-1 β apresentam valores bastante semelhantes nas diferentes localizações avaliadas.

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Hatem Alassy, Praveen Parachuru, Larry Wolff.	2019	“Peri-Implantitis Diagnosis and Prognosis Using Biomarkers in Peri- Implant Crevicular Fluid: A Narrative Review” (Revisão narrativa)	- Resumir o conhecimento atual acerca dos biomarcadores no FCPI e no diagnóstico da PI, além de avaliar o seu potencial na previsão da progressão da doença.	_____	- A avaliação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) e MMP-8 no FCPI podem ser úteis para diagnosticar a PI e a MPI. - A evidência atual permanece insuficiente para indicar o potencial destas citocinas na previsão da progressão da PI.
Duarte PM, Serrão CR, Miranda TS, Zanatta LCS, Bastos MF, Faveri M, Figueiredo LC, Feres M.	2016	“Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with periimplantitis? A systematic review” (Revisão Sistemática)	- Responder à questão: “Os níveis de citocinas no FCPI podem ser utilizados para distinguir os implantes saudáveis dos implantes com peri-implantite?”	- Dos 18 estudos incluídos, 9 relataram valores estatisticamente significativos em relação aos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no FCPI de implantes com PI, comparativamente aos implantes saudáveis.	- Os níveis de evidência são moderados, relativamente à associação entre as concentrações elevadas das citocinas pró-inflamatórias no FCPI e a PI.

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Fawad Javed, Khalid Al-Hezaimi, Ziad Salameh, Khalid Almas, Georgios E. Romanos.	2011	“Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis” (Revisão Sistemática)	- Avaliar os perfis das citocinas pró-inflamatórias no FCPI de pacientes com PI.	- Dos 15 estudos analisados na revisão sistemática, 4 e 6 estudos, validaram a associação entre a IL-1 β e o TNF- α , respectivamente, com a PI.	- A monitorização das concentrações das citocinas possibilita a detecção precoce das condições inflamatórias, mesmo que não sejam ainda clinicamente detetáveis.
Erhan Dursun, Tolga Fikret Tözüm.	2016	“Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: a Systemetic Review” (Revisão Sistemática)	- Rever o conhecimento atual acerca dos biomarcadores e enzimas associados a doenças peri-implantares e de que forma é que as suas concentrações influenciam a patogénese das doenças inflamatórias em redor dos implantes dentários.	- Entre os 19 estudos avaliados, 13 e 7 estudos confirmaram a relação da IL-1 β e do TNF- α , respectivamente, com a inflamação peri-implantar. - Outros 3 estudos não verificaram nenhuma associação entre o TNF- α e a PI. - 5 estudos não constatarem diferenças significativa entre os grupos saudáveis e doentes.	- A IL-1 β e o TNF- α são, atualmente, as citocinas pró-inflamatórias mais utilizadas para auxiliar o diagnóstico precoce da PI.

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Fernanda Faot, Gustavo G. Nascimento, Amália M. Bielemann, Thiago D. Campão, Fábio R. M. Leite, Marc Quirynen.	2015	“Can Peri-Implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of Peri- Implantitis? A Systematic Review and Meta-Analysis” (Revisão Sistemática e Meta-análise)	- Confirmar se os pacientes com PI apresentam maior nível de citoquinas pró- inflamatórias no FCPI, em comparação com pacientes saudáveis e se a medição da inflamação local pode ser utilizada como preditor da PI.	- Todos os estudos demonstraram que os valores das citoquinas pró-inflamatórias no FCPI, com destaque para a IL-1 β e o TNF- α , aumentaram nas localizações afetadas pela MPI e PI, em relação às localizações saudáveis.	- Tanto o TNF- α , como a IL- 1 β , existentes no fluido crevicular de bolsas peri- implantares podem ser utilizados com o objetivo de diagnosticar precocemente a PI.
JM Salcetti, JD Moriarty, LF Cooper, FW Smith, JG Collins, SS Socransky, S Offenbacher.	1997	“The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant” (Estudo transversal)	- Fornecer informação atualizada sobre os níveis dos mediadores inflamatórios, de fatores de crescimento e de patógenos bacterianos associados a implantes com peri-implantite, em comparação com implantes saudáveis.	- Foram detetadas concentrações elevadas de PGE2 nos pacientes com implantes afetados pela PI, em relação aos pacientes com implantes saudáveis.	- Existe uma associação entre os níveis elevados de PGE2 e uma maior frequência de <i>P. nigrescens</i> e <i>P. micros</i> , fornecendo um método de diagnóstico adicional nos implantes com PI

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
H Aboyoussef, C Carter, JJ Jandinski, FS Panagakos.	1998	“Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid” (Estudo transversal)	- Avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na perda óssea da peri-implantite, através da análise da PGE2 e enzimas proteolíticas, mais especificamente as MMP no FCPI.	- Os resultados indicaram que os níveis de PGE2 nas localizações saudáveis não são significativamente diferentes das localizações afetadas pela PI.	- Os níveis de PGE2 e MMP não são marcadores biológicos úteis para distinguir implantes saudáveis de implantes com PI.
Serdar Yalcin, Cansu Basegmez, Eitan Mijiritsky, Funda Yalcin, Gulden Isik, Utku Onan.	2005	“Detection of Implant Crevicular Fluid Prostaglandin E2 Levels for the Assessment of Peri-implant Health: A Pilot Study” (Estudo transversal)	- Avaliar os níveis de PGE2 no FCPI e a possibilidade de utilizar este método para diagnosticar a MPI.	- Foram detetadas diferenças estatisticamente significativas em relação às concentrações da PGE2 no grupo teste.	- É prevista a possibilidade da utilização de testes bioquímicos, particularmente da detecção dos níveis de PGE2 no FCPI ser considerado um meio de diagnóstico adequado para o controle de implantes funcionais

Tabela 2. Evidência científica apresentada sobre a associação entre a L-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite.

Autores	Ano	Nome e Tipo de estudo	Objetivos	Resultados	Conclusões
Ali-Reza Ketabi, Hjalmar Friese, Heiner Weber.	2017	“A Comparison Of, IL-1 β , PGE2, Pai-2 and TNF- α , Levels in Gingival Crevicular Fluid (Gcf) and Peri-Implant Crevicular Fluid (Picf) from Groups of Patients with Healthy Teeth, Healthy Implants, Periodontitis and Peri-Implantitis” (Estudo transversal)	- Analisar simultaneamente 4 biomarcadores no FCG e no FCPI de 41 pacientes em 4 grupos diferentes (dentes saudáveis, implantes saudáveis, periodontite e peri-implantite) durante um período de 6 meses.	- A PGE2 registou níveis mais elevados no FCPI do grupo com PI, em comparação com o FCPI de implantes saudáveis. - O nível médio de PGE2 no FCG de dentes saudáveis foi duas vezes maior, do que o nível registado no FCPI de implantes saudáveis.	- Os níveis significativamente mais elevados de IL-1 β e PGE2 nos dentes saudáveis, em relação aos implantes saudáveis, pode ser em parte devido à falta de células do ligamento periodontal em redor dos implantes. Outra possível explicação poderia ser a propriedade anti-inflamatória das superfícies de titânio dos implantes.
Cansu Basegmez, Serdar Yalcin, Funda Yalcin, Selim Ersanli, Eitan Mijiritsky.	2012	“Evaluation of Periimplant Crevicular Fluid Prostaglandin E2 and Matrix Metalloproteinase-8 Levels From Health to Periimplant Disease Status: A Prospective Study” (Estudo prospetivo)	- Comparar os níveis de PGE2 e de MMP-8 no FCPI após a osteointegração e reabilitação dos implantes com próteses fixas ou parciais.	- Após o 12º mês observou-se um aumento do nível de PGE2, sendo que este atingiu o seu pico ao 18º mês.	- A deteção de PGE2 e MMP-8 no FCPI podem ser úteis para monitorizar a progressão da doença peri-implantar.

6. Meios de Recolha e Quantificação do Volume do Fluido Crevicular Peri-Implantar

A evolução da tecnologia e a possibilidade de utilizar o FCPI como meio de estudo da inflamação a nível dos tecidos periodontais e consequente diagnóstico da PI levou inúmeros investigadores a focarem-se na recolha e análise do mesmo (Alassy et al., 2019; Wassall & Preshaw, 2016). Segundo Ciantar & Caruana (1998), a análise bioquímica do FCPI recebe atualmente uma atenção redobrada pelas potencialidades que apresenta.

O processo que envolve a recolha do FCPI é considerado um processo não invasivo, indolor e relativamente simples, em comparação, por exemplo, a uma biópsia do tecido gengival (Wassall & Preshaw, 2016). Como tal, quando se trata da obtenção do FCPI podem ser utilizados diversos métodos, nomeadamente a técnica de lavagem gengival, na qual o sulco é irrigado com uma solução isotónica e o fluido obtido consiste numa diluição do fluido crevicular, composto por células e componentes solúveis. Outra opção são os tubos capilares ou micropipetas de tamanhos conhecidos, que são inseridos superficialmente no sulco gengival após o isolamento e secagem da localização, com o objetivo de recolher e quantificar o volume. As tiras de papel absorvente, que é uma técnica de utilização fácil, rápida e não traumática, também podem ser usadas como método de recolha do fluido crevicular gengival. As tiras são inseridas no sulco, ou bolsa gengival por um período de tempo determinado, permitindo a recolha do fluido (Alassy et al., 2019; Chibebe et al., 2008; Ciantar & Caruana, 1998; Griffiths, 2003; Guentsch et al., 2011).

A técnica mais frequentemente referida na literatura é a das tiras de papel absorvente. Os Periopapers são papéis de filtro pré-esterilizados com uma porção absorvente a inserir no sulco e outra extremidade revestida por plástico para manusear com a pinça. Com cerca de 1,4 cm de comprimento, os Periopapers conseguem absorver volumes de fluido até 1,2 μ l (Alassy et al., 2019; Bevilacqua et al., 2016; Wassall & Preshaw, 2016). A sua inserção no sulco é realizada até ser sentida uma resistência leve, não mais do que 1 a 2 mm no sulco, para que seja possível a absorção do fluido. Na tentativa de inserir o Periopaper até ao fundo do sulco, este fica mais saturado de fluido e tem tendência a dobrar sob pressão, além de ser contaminado mais facilmente com sangue (Figura 2). As amostras devem ser descartadas quando contaminadas com sangue ou saliva, face à alteração da sua composição e volume (Attar et al., 2018). De acordo

com o protocolo, o Periopaper é mantido no sulco por 30 segundos até ser retirado (Alassy et al., 2019; Wassall & Preshaw, 2016).



Figura 2: Periopaper inserido no sulco/bolsa contaminado com sangue.

Inicialmente para quantificar o volume de FCPI recolhido de uma localização eram utilizadas a coloração de ninidrina, ou os métodos de marcação fluorescente. No entanto, o uso destas técnicas impedia a posterior análise bioquímica da composição do fluido (Wassall & Preshaw, 2016).

O Periotron (Figura 3) é um dispositivo eletrónico criado como método alternativo para medir o volume do fluido crevicular gengival e do fluxo salivar recolhido numa tira de papel absorvente (Attar et al., 2018; Ciantar & Caruana, 1998; Wassall & Preshaw, 2016). Os elétrodos do Periotron contêm cargas opostas, criando assim um campo elétrico que, consequentemente, induz a polaridade das moléculas, reduzindo a diferença de potencial entre as placas e aumentando a capacitância. Quanto maior o número de moléculas polares posicionadas entre os elétrodos, maior a capacitância e dessa forma, maiores os valores registados pelo Periotron. Deste modo, este dispositivo eletrónico funciona de acordo com um princípio baseado na medição da capacidade elétrica de um Periopaper húmido, colocado entre os seus elétrodos, após a colheita da amostra (Ciantar & Caruana, 1998; Wassall & Preshaw, 2016).



Figura 3: Periotron 8000 (Oraflow Inc., New York, NY, USA).

Segundo Griffiths (2003) uma leitura de 0 a 20 no Periotron indica que o tecido se encontra saudável e que apresenta pouco ou nenhum sinal de inflamação. Por outro lado, uma leitura de 21 a 40 revela sinais de inflamação leves. No caso de uma condição inflamatória moderadamente grave as medições registam valores entre 41 e 80, sendo que valores acima de 81 até 200 indicam a presença de inflamação muito grave. Resumidamente, os valores de leitura do Periotron aumentam de acordo com a severidade da inflamação. No entanto, com uma leitura de 41 já é expectável que a atividade bacteriana e o nível de putrefação sejam considerados um fator de risco considerável para o desenvolvimento de doenças periodontais e peri-implantares. Quanto mais tempo o FCPI estiver acima desses valores, maior a possibilidade de um método relativamente sensível como o da medição da profundidade de sondagem, indicar danos periodontais e peri-implantares.

Os valores de leitura do Periotron podem ser convertidos em volume (μ l) a partir de curvas de calibração, utilizando quantidades de fluido definidas, pipetadas com precisão e Periopapers (Figura 4). Ao configurar a curva de calibração, cada volume deve ser testado pelo menos três vezes no Periotron e a média de leituras deve ser calculada para esse mesmo volume. O soro, por ter uma viscosidade semelhante à do FCG, é geralmente o fluido indicado para este propósito. Contudo, também a água destilada e a saliva podem ser utilizadas (Bhardwaj & Prabhuji, 2013; Ciantar & Caruana, 1998;

Wassall & Preshaw, 2016). A calibração do Periotron deve ser realizada segundo as recomendações do fabricante, antes de se iniciar o processo de recolha de amostras (Bevilacqua et al., 2016; Bhardwaj & Prabhuji, 2013).

Vários tipos de modelos de regressão foram propostos para resolver a equação da curva de calibração que é gerada. Todavia, a versão mais atual do Periotron, o Periotron 8000 (1995) é disponibilizado com um *software* que tem a capacidade de calcular volumes do FCG utilizando uma regressão polinomial de 4ª ordem (Wassall & Preshaw, 2016).

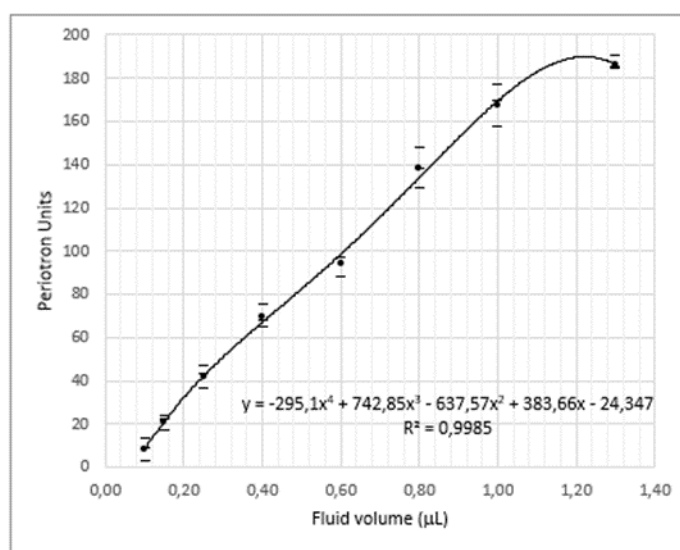


Figura 4: Exemplo de curva de calibração.

O Periotron é deste modo considerado um dispositivo que auxilia tanto no diagnóstico precoce das condições periodontais e peri-implantares, como na monitorização de pacientes durante a fase de manutenção do tratamento (Attar et al., 2018).

Segundo Chibebe et al. (2008) existem aspetos que podem interferir na obtenção adequada de amostras do FCPI, nomeadamente o tempo de recolha, sendo que a literatura mais antiga sugere o mínimo de 5 segundos para a recolha da amostra. Adicionalmente, são descritas complicações relacionadas sobretudo com os níveis de proteínas quando o tempo é prolongado. A evaporação da amostra é também considerada uma limitação que pode influenciar o processo de medição do volume e resultar em erros volumétricos, em especial quando se trata de pequenos volumes de FCPI. Esse fenómeno de evaporação da amostra pode afetar ainda a recuperação do FCPI, que se realiza através da técnica de

eluição, posteriormente à recolha da amostra do FCPI e previamente à análise da sua composição.

Após a recolha do FCPI e consequente determinação do seu volume, os Periopapers que contêm as amostras devem ser colocados em criotubos com, ou sem solução tampão, congelados em nitrogénio líquido e armazenados numa arca congeladora a -80°C para sua posterior análise (Wassall & Preshaw, 2016). Outra opção consiste em colocar as amostras em tubos *ependdorf*, dentro de uma caixa térmica com gelo, até serem armazenadas a -80°C (Zani et al., 2016).

7. Análise do Conteúdo Imunológico do Fluido – Técnicas – ELISA e Luminex

Devido aos avanços na tecnologia, a proteómica é um método que permite a análise do FCG com valor a nível de prognóstico e diagnóstico, devido ao reconhecimento e identificação dos biomarcadores da saúde e doença periodontal. A palavra proteómica deriva da palavra “proteoma”, que consiste no conjunto de proteínas expressas numa dada condição. Este método é considerado uma abordagem poderosa na investigação biomédica, ao examinar os componentes principais dos sistemas bioquímicos, nomeadamente as proteínas (Ghallab, 2018).

Em virtude dos níveis baixos de citocinas e dos volumes de amostragem pequenos, são requisitados métodos sensíveis para uma quantificação rigorosa dos mediadores presentes no fluido crevicular gengival/peri-implantar. Assim sendo, técnicas como os bioensaios, radioimunoensaios, ensaios multiplex e ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) têm sido aplicados com o objetivo de detetar e quantificar as citocinas em amostras biológicas (Wassall & Preshaw, 2016).

Todavia, as investigações mais recentes que avaliam os mediadores do FCG utilizam maioritariamente a técnica ELISA, devido à sua especificidade e sensibilidade nas interações antígeno-anticorpo (Liu et al., 2009; Shah & Maghsoudlou, 2016; Wassall & Preshaw, 2016). Uma das vantagens do ELISA é a possibilidade de utilização em diversos tipos de amostras, quer seja saliva, fluido crevicular gengival, ou mesmo sangue (Alhajj & Farhana, 2022; Wassall & Preshaw, 2016).

A técnica ELISA consiste na captura de antígenos por anticorpos ligados a marcadores enzimáticos nos poços de microplacas, também designadas de placas de

microtitulação, resultando num conjugado com atividade imunológica e enzimática. Ao utilizar um substrato incolor dessa enzima ligado a um cromogéneo e após a reação enzimática, o resultado é um produto final colorido observável e mensurável. A intensidade da cor nos poços pode ser medida através da leitura da absorvância e a quantidade do antigénio é determinada ao ser comparada a uma curva padrão (Aydin, 2015; Shah & Maghsoudlou, 2016; Wassall & Preshaw, 2016). Na prática laboratorial, é comum a realização do imunoensaio numa microplaca com cerca de 48 a 96 poços de amostra (Liu et al., 2009).

Relativamente às desvantagens apresentadas pela técnica destacam-se, por exemplo, a manipulação exigente das amostras, o consumo elevado de reagentes com um custo igualmente elevado, o tempo de incubação prolongado e o facto de geralmente ser utilizado apenas um ELISA para uma única amostra de fluido crevicular gengival e analito a ser estudado (Liu et al., 2009; Shah & Maghsoudlou, 2016; Wassall & Preshaw, 2016).

Deste modo, foram desenvolvidos os imunoensaios multiplex, como a técnica Luminex, com o intuito de quantificar múltiplas citoquinas numa única amostra. O Luminex 100/200™ tem a capacidade de analisar 100 analitos diferentes, no mesmo volume de amostra em simultâneo, guiando-se pelos princípios da citometria de fluxo (Khalifian et al., 2015; Wassall & Preshaw, 2016; Waterboer et al., 2006).

De forma mais detalhada, esta técnica baseia-se sobretudo na ancoragem dos reagentes à superfície de microsferas de polistireno marcadas com dois fluoróforos, cada um com proporções estabelecidas em cada microesfera. Assim, o espectro de emissão de cada microesfera é único, resultando em 100 conjuntos de microesferas diferentes que podem ser identificadas simultaneamente, além da reação que está a ocorrer em cada superfície. A placa na qual o teste é realizado é lida no sistema Luminex 100/200™, onde as microesferas passam pelo fluxo da corrente. Como dito anteriormente, o sistema Luminex funciona de modo semelhante a uma citometria de fluxo com dois lasers, sendo que um deles permite a identificação do conjunto de microesferas com base no perfil de emissão dos fluoróforos internos e o outro laser é utilizado para excitar o fluoróforo ligado a cada esfera (Khalifian et al., 2015; Lukacs et al., 2005; Waterboer et al., 2006).

Na hipótese de serem obtidos grandes volumes de amostra, qualquer uma das duas técnicas pode ser considerada uma opção válida para a análise do seu conteúdo. Contudo, se o volume for limitado, como é o caso de amostras de fluido cefalorraquidiano, fluido crevicular gengival, fluido sinovial, lágrimas, soro de rato, entre outras, o sistema

Luminex 100/200™ tem a vantagem relativamente à técnica ELISA, de conseguir analisar inúmeros parâmetros, utilizando uma amostra bastante pequena de volume. No que concerne à duração da análise, qualquer uma das técnicas pode ser selecionada para avaliar um parâmetro. Todavia, se for necessário analisar vários parâmetros, o sistema Luminex poupa tempo ao analisar todos os parâmetros concomitantemente (Khalifian et al., 2015; Wassall & Preshaw, 2016).

Em suma, os ensaios ELISA e Luminex são amplamente utilizados em investigações no âmbito da biologia, bioquímica, medicina e sobretudo na área da medicina dentária, onde acrescentam variáveis imunológicas nesse campo de investigação e auxiliam no diagnóstico, prognóstico e tratamento ao analisar a resposta imune dos pacientes. Embora a sua importância tenha vindo a ser demonstrada sobretudo nos estudos que avaliam a resposta imune do hospedeiro a diversas infeções bacterianas, também apresentam um papel importante no entendimento dos mecanismos de remodelação óssea, envolvidos na doença periodontal, através de estudos “in vitro”. Além disso, contribuem para a investigação de doenças sistémicas associadas ao desenvolvimento de patologias orais (Alhajj & Farhana, 2022; Wassall & Preshaw, 2016).

A cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) têm sido amplamente aplicadas para estudar as biomoléculas, sendo um dos seus campos de desenvolvimento a análise global de proteínas, a proteómica. Em especial, acredita-se que a LC-MS/MS represente uma das abordagens para o diagnóstico clínico a partir da análise de biomarcadores abundantes. Entre os principais objetivos da proteómica associada a MS deve destacar-se a identificação e a quantificação de proteínas e das suas modificações após tradução, numa mistura de proteínas purificada, enriquecida ou complexa (Kido et al., 2012; Matthiesen & Bunkenborg, 2013).

Apesar de existirem diversas tecnologias alternativas e mais recentes para identificar proteínas, nomeadamente o ELISA e a espectrometria de massa (MS), como mencionado anteriormente, todas apresentam as suas limitações. Assim, o Western blotting (WB) continua a ser referido na literatura como um dos métodos mais comumente utilizados no laboratório para a deteção de proteínas. O WB consiste numa técnica experimental baseada em anticorpos, frequentemente utilizada em estudos para separar e identificar proteínas-alvo extraídas de misturas complexas de células ou tecidos. Primeiramente, nesta técnica é utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para separar a mistura de proteínas com base no

seu peso molecular. De seguida, as proteínas já separadas são transferidas para uma membrana sólida. Esta transferência ocorre devido à formação de um campo elétrico perpendicular à superfície do gel, o que resulta na movimentação das proteínas para a membrana e, após ligação à mesma, produzem uma banda. A membrana é então incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse. Um dos procedimentos fundamentais no protocolo desta técnica é a lavagem do anticorpo não ligado, de forma a permanecer apenas o anticorpo ligado à proteína. Os anticorpos ligados são geralmente marcados com uma enzima e detetados na membrana pelo sinal que produzem, correspondente à posição da proteína-alvo. Este sinal é capturado num filme revelado num quarto escuro. Uma vez que os anticorpos apenas se ligam à proteína de interesse, deve ser visível uma única banda. A espessura da banda corresponde à quantidade de proteína presente (Mahmood & Yang, 2012; Tie et al., 2021).

III. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, a expectativa dos pacientes face à reabilitação protética tem vindo a alterar-se, no sentido em que priorizam opções de reabilitação que valorizam a estética, funcionalidade, conforto e longevidade. Deste modo, tem sido registado um aumento exponencial na reabilitação de espaços edêntulos com recurso à Implantologia e, consequentemente, uma correlação positiva com a prevalência das doenças associadas, nomeadamente a peri-implantite. A peri-implantite é uma patologia que põe em causa a osteointegração do implante e consequentemente a reabilitação protética efetuada, devido à degradação dos tecidos de suporte peri-implantares subjacente a esta condição. Por conseguinte, torna-se fundamental agir a nível da prevenção da doença, bem como do seu diagnóstico precoce, com o objetivo de proceder ao tratamento peri-implantar num estágio inicial e evitar futuras complicações irreversíveis.

A análise dos níveis dos biomarcadores presentes no fluido crevicular peri-implantar complementa os métodos tradicionais de diagnóstico da peri-implantite e permite ainda detetar a doença através da utilização de uma técnica indolor, segura e confortável para o paciente.

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α destacam-se no estabelecimento e progressão da doença peri-implantar pela sua atuação sinérgica e papel desempenhado na inflamação, destruição tecidular e reabsorção óssea, assim como a PGE2 que atua, igualmente, na reabsorção óssea, através da ativação dos osteoclastos. Com base na evidência científica apresentada acerca da associação destes biomarcadores com a peri-implantite, conclui-se que, embora exista alguma incoerência nos resultados dos vários estudos, a sua maioria, como é comprovado pelas revisões sistemáticas, verifica níveis elevados de IL-1 β , TNF- α e PGE2 no fluido crevicular peri-implantar de localizações afetadas pela doença, em comparação com as localizações saudáveis.

Contudo, considerando que a maioria das investigações são estudos transversais, surge a necessidade de desenvolver mais estudos longitudinais controlados, para sustentar esta afirmação. Adicionalmente, é importante referir a existência de uma evidência bibliográfica mais robusta no que se refere à IL-1 β e TNF- α , em comparação com a PGE2.

A associação positiva entre a IL-1 β , TNF- α e PGE2 e a peri-implantite comprova o potencial da análise destes biomarcadores na deteção precoce desta doença, ao atuarem como um método complementar de diagnóstico.

O Médico Dentista deve considerar todos os métodos capazes de auxiliar no diagnóstico de uma doença que se encontre ainda em fase inicial, ou seja, sem sinais clínicos visíveis. Desta forma, é possível prevenir a progressão da doença e preservar o sucesso da reabilitação realizada, além de alcançar as expectativas do paciente.

Por fim, a criação de um teste rápido e passível de ser utilizado num consultório dentário, que possibilite a análise da concentração destes biomarcadores, poderá vir a ser um meio de diagnóstico e controlo fundamental para a peri-implantite.

IV. BIBLIOGRAFIA

Aboyoussef, H., Carter, C., Jandinski, J. J., & Panagakos, F. S. (1998). Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 13(5), 689–696. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9796154/>

Alassy, H., Parachuru, P., & Wolff, L. (2019). Peri-Implantitis Diagnosis and Prognosis Using Biomarkers in Peri-Implant Crevicular Fluid: A Narrative Review. *Diagnostics*, 9(4), 214. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040214>

Albrektsson, T., & Isidor, F. (1994). Consensus report: implant therapy. In N. P. Lang & T. Karring (Eds.), *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology* (pp. 365–369). Berlin: Quintessence.

Alkan, E. A., Tüter, G., Parlar, A., Yücel, A., & Kurtiş, B. (2016). Evaluation of peri-implant crevicular fluid prostaglandin E 2 levels in augmented extraction sockets by different biomaterials. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(7), 532–538. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1214979>

Araujo, M. G., & Lindhe, J. (2018). Peri-implant health. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S230–S236. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12952>

Arikan, F., Buduneli, N., & Lappin, D. F. (2011). C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble RANKL, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: A case-control study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 26(2), 282–289. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21483881/>

Atieh, M. A., Alsabeeha, N. H. M., Faggion, C. M., & Duncan, W. J. (2012). The Frequency of Peri-Implant Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 84(11), 1586-1598. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120592>

Attar, N. B., Banodkar, A. B., Gaikwad, R. P., Sethna G. D., Patil, C. L., & Simon, S. (2018). Evaluation of gingival crevicular fluid volume in relation to clinical

periodontal status with periotron 8000. *International Journal of Applied Dental Sciences*, 4(1), 68-71. <https://www.oraljournal.com/pdf/2018/vol4issue1/PartB/4-1-3-675.pdf>

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

Båge, T., Kats, A., Lopez, B. S., Morgan, G., Nilsson, G., Burt, I., Korotkova, M., Corbett, L., Knox, A. J., Pino, L., Jakobsson, P.-J., Modéer, T., & Yucel-Lindberg, T. (2011). Expression of Prostaglandin E Synthases in Periodontitis. *The American Journal of Pathology*, 178(4), 1676–1688. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.048>

Basegmez, C., Yalcin, S., Yalcin, F., Ersanli, S., & Mijiritsky, E. (2012). Evaluation of periimplant crevicular fluid prostaglandin e2 and matrix metalloproteinase-8 levels from health to periimplant disease status: A prospective study. *Implant Dentistry*, 21(4), 306–310. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182588408>

Barros, S. P., Williams, R., Offenbacher, S., & Morelli, T. (2016). Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(1), 53–64. <https://doi.org/10.1111/prd.12107>

Beck, J. D. (1998). Risk revisited. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 26(4), 220–225. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1998.tb01954.x>

Belibasakis, G. N., & Manoil, D. (2021). Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *Journal of Dental Research*, 100(1), 21–28. <https://doi.org/10.1177/0022034520949851>

Benoit, M., Desnues, B., & Mege, J. L. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology*, 181(6), 3733–3739. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>

Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K.-T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen,

- M., Renvert, S., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S286–S291. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>
- Berglundh, T., Gislason, O., Lekholm, U., Sennerby, L., & Lindhe, J. (2004). Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(5), 341–347. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00486.x>
- Berglundh, T., Lindhe, J., Ericsson, I., Marinello, C. P., Liljenberg, B., & Thomsen, P. (1991). The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clinical oral implants research*, 2(2), 81–90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020206.x>
- Bevilacqua, L., De Biasi, M., Lorenzon, M. G., Frattini, C., & Angerame, D. (2016). Volumetric Analysis of Gingival Crevicular Fluid and Peri-Implant Sulcus Fluid in Healthy and Diseased Sites: A Cross-Sectional Split-Mouth Pilot Study. *The Open Dentistry Journal*, 10(1), 131–138. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010131>
- Bharadwaj, B., & Varghese, S. (2018). Role of interleukin-1 in peri-implantitis. *Drug Invention Today*, 10(3), 3388–3390. <https://web.s.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=3ed75819-9113-4360-bfd1-a52ef145f921%40redis>
- Bhardwaj, S., & Prabhuji, M. L. V. (2013). Comparative volumetric and clinical evaluation of peri-implant sulcular fluid and gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 43(5), 233. <https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.5.233>
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Bostanci, N., İlgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Töz, H., Atilla, G., Hughes, F. J., & Belibasakis, G. N. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(5), 370–376. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01061.x>

Boyce, B. F., Li, P., Yao, Z., Zhang, Q., Badell, I. R., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J., & Xing, L. (2005). TNFa and pathologic bone resorption. *Keio J Med*, 54(3), 127-131. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.127>

Brill, N. (1960). Gingival Conditions Related to Flow of Tissue Fluid Into Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 18(4), 421–446. <https://doi.org/10.3109/00016356009043875>

Carcuac, O., & Berglundh, T. (2014). Composition of Human Peri-implantitis and Periodontitis Lesions. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1083–1088. <https://doi.org/10.1177/0022034514551754>

Casado, P. L., Canullo, L., de Almeida Filardy, A., Granjeiro, J. M., Barboza, E. P., & Leite Duarte, M. E. (2013). Interleukins 1 β and 10 Expressions in the Periimplant Crevicular Fluid From Patients With Untreated Periimplant Disease. *Implant Dentistry*, 22(2), 143–150. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182818792>

Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>

Charalampakis, G., & Belibasakis, G. N. (2015). Microbiome of peri-implant infections: Lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses. *Virulence*, 6(3), 183–187. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.980661>

Chibebe, P. C., Terreri, M., Ricardo, L. H., & Pallos, D. (2008). Uma visão atual do fluido gengival crevicular como método de diagnóstico periodontal. *Rev. Ciênc. Méd.*, 17(3-6), 163–173. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/04/541589/754-1532-1-sm.pdf>

Ciantar, M., & Caruana, D. J. (1998). Periotron 8000: Calibration characteristics and reliability. *Journal of Periodontal Research*, 33(3), 259–264. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1998.tb02318.x>

Cimasoni, G. (1974). The crevicular fluid. *Monographs in oral science*, 3, 1–122.

Corrêa, M. G., Pimentel, S. P., Ribeiro, F. V., Cirano, F. R., & Casati, M. Z. (2019). Host response and peri-implantitis. *Brazilian Oral Research*, 33(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0066>

da Silva, R. J., Issa, J. P. M., Semprini, M., da Silva, C. H. L., de Vasconcelos, P. B., Celino, C. A., Siéssere, S., & Regalo, S. C. H. (2011). Clinical feasibility of mandibular implant overdenture retainers submitted to immediate load: Clinical feasibility of mandibular implant overdenture. *Gerodontology*, 28(3), 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1741-2358.2010.00374.x>

Delima, A. J., & Van Dyke, T. E. (2003). Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid: Cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31(1), 55–76. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03105.x>

Derks, J., & Tomasi, C. (2015). Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), S158–S171. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12334>

Duarte, P. M., de Mendonça, A. C., Máximo, M. B. B., Santos, V. R., Bastos, M. F., & Nociti, F. H. (2009). Effect of Anti-Infective Mechanical Therapy on Clinical Parameters and Cytokine Levels in Human Peri-Implant Diseases. *Journal of Periodontology*, 80(2), 234–243. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.070672>

Duarte, P. M., Serrão, C. R., Miranda, T. S., Zanatta, L. C. S., Bastos, M. F., Faveri, M., Figueiredo, L. C., & Feres, M. (2016). Could cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid be used to distinguish between healthy implants and implants with peri-implantitis? A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 51(6), 689–698. <https://doi.org/10.1111/jre.12354>

Dursun, E., & Tözüm, T. F. (2016). Peri-Implant Crevicular Fluid Analysis, Enzymes and Biomarkers: A Systemetic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 7(3), 1-12. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7309>

Faot, F., Nascimento, G. G., Bielemann, A. M., Campão, T. D., Leite, F. R. M., & Quirynen, M. (2015). Can Peri-Implant Crevicular Fluid Assist in the Diagnosis of

Peri-Implantitis? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 86(5), 631–645. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140603>

Ganowicz, E. (2011). Salivary Diagnostics – Diseases of the Oral Cavity. *Dent Med Probl*, 48(3), 421–30. <https://dmp.umw.edu.pl/en/article/2011/48/3/421/>

Ghallab, N. A. (2018). Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Archives of Oral Biology*, 87, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.022>

Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391–401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>

Graves, D. T., Oates, T., & Garlet, G. P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*, 3, 1-15. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>

Griffiths, G. S. (2003). Formation, collection and significance of gingival crevice fluid: Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31(1), 32–42. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x>

Guentsch, A., Kramesberger, M., Sroka, A., Pfister, W., Potempa, J., & Eick, S. (2011). Comparison of Gingival Crevicular Fluid Sampling Methods in Patients With Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82(7), 1051–1060. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100565>

Gürlek, Ö., Gümüş, P., Nile, C. J., Lappin, D. F., & Buduneli, N. (2017). Biomarkers and Bacteria Around Implants and Natural Teeth in the Same Individuals. *Journal of Periodontology*, 88(8), 752–761. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.160751>

Heitz-Mayfield, L. J. A., & Lang, N. P. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. Peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 167–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00348.x>

- Heitz-Mayfield, L. J. A., & Salvi, G. E. (2018). Peri-implant mucositis. *Journal of Periodontology*, 89(1), S257–S266. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0488>
- Hultin, M., Gustafsson, A., Hallström, H., Johansson, L.-Å., Ekfeldt, A., & Klinge, B. (2002). Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis: Microbiota and host response in peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 13(4), 349–358. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130402.x>
- Javed, F., Al-Hezaimi, K., Salameh, Z., Almas, K., & Romanos, G. E. (2011). Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Cytokine*, 53(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.08.013>
- Javed, F., & Almas, K. (2010). Osseointegration of Dental Implants in Patients Undergoing Bisphosphonate Treatment: A Literature Review. *Journal of Periodontology*, 81(4), 479–484. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090587>
- Ketabi, A. R., Friese, H., & Weber, H. (2017). A comparison of il-1 β , e2 (Pge2), pai-2 and tnf- α levels in gingival crevicular fluid (Gcf) and peri-implant crevicular fluid (Picf) from groups of patients with healthy teeth, healthy implants, periodontitis and peri-implantitis. *Dentistry*, 7(8), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000445>
- Khalifian, S., Raimondi, G., & Brandacher, G. (2015). The use of luminex assays to measure cytokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(4), 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.36>
- Khurshid, Z., Mali, M., Naseem, M., Najeeb, S., & Zafar, M. (2017). Human Gingival Crevicular Fluids (GCF) Proteomics: An Overview. *Dentistry Journal*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.3390/dj5010012>
- Kido, J., Bando, M., Hiroshima, Y., Iwasaka, H., Yamada, K., Ohgami, N., Nambu, T., Kataoka, M., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Sagawa, I., & Nagata, T. (2012). Analysis of proteins in human gingival crevicular fluid by mass spectrometry: Mass spectrometric analysis of gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontal Research*, 47(4), 488–499. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01458.x>
- Klinge, B., Hultin, M., & Berglundh, T. (2005). Peri-implantitis. *Dental Clinics of North America*, 49(3), 661–676. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2005.03.007>

- Koldslund, O. C., Scheie, A. A., & Aass, A. M. (2010). Prevalence of Peri-Implantitis Related to Severity of the Disease With Different Degrees of Bone Loss. *Journal of Periodontology*, 81(2), 231–238. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090269>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kormas, I., Pedercini, C., Pedercini, A., Raptopoulos, M., Alassy, H., & Wolff, L. F. (2020). Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Antibiotics*, 9(11), 835. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110835>
- Lang, N. P., Berglundh, T., & on Behalf of Working Group 4 of the Seventh European Workshop on Periodontology (2011). Periimplant diseases: Where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology: Periimplant diseases: where are we now? *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 178–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>
- Li, J. Y., & Wang, H.-L. (2014). Biomarkers Associated With Periimplant Diseases. *Implant Dentistry*, 23(5), 605–611. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000129>
- Lindhe, J., Meyle, J., & on behalf of Group D of the European Workshop on Periodontology. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8), 282–285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01283.x>
- Liu, Y., Wang, H., Huang, J., Yang, J., Liu, B., & Yang, P. (2009). Microchip-based ELISA strategy for the detection of low-level disease biomarker in serum. *Analytica Chimica Acta*, 650(1), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.048>
- Lukacs, Z., Dietrich, A., Ganschow, R., Kohlschütter, A., & Kruithof, R. (2005). Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots – a feasibility study using a multi-analyte immunoassay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 43(2), 141–145. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.023>

- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maney, P., Schiavo, J. H., Mascarenhas, F., & Dragonas, P. (2020). Risk Factors for Peri-implantitis. *Current Oral Health Reports*, 7(3), 234–248. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00276-0>
- Matthiesen, R., & Bunkenborg, J. (2013). Introduction to mass spectrometry-based proteomics. In R. Matthiesen (Eds.), *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* (pp. 1–45). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3_1
- Miller, C. S., Foley, J. D., Bailey, A. L., Campell, C. L., Humphries, R. L., Christodoulides, N., Floriano, P. N., Simmons, G., Bhagwandin, B., Jacobson, J. W., Redding, S. W., Ebersole, J. L., & McDevitt, J. T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*, 4(1), 171–189. <https://doi.org/10.2217/bmm.09.68>
- Minamizaki, T., Yoshiko, Y., Kozai, K., Aubin, J. E., & Maeda, N. (2009). EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone*, 44(6), 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.010>
- Nasry, W. H. S., Rodriguez-Lecompte, J. C., & Martin, C. K. (2018). Role of COX-2/PGE2 Mediated Inflammation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, 10(10), 348. <https://doi.org/10.3390/cancers10100348>
- Nowzari, H., Phamduong, S., Botero, J. E., Villacres, M. C., & Rich, S. K. (2012). The Profile of Inflammatory Cytokines in Gingival Crevicular Fluid around Healthy Osseointegrated Implants: Profile of Inflammatory Cytokines. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(4), 546–552. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00299.x>
- Persson, G. R., & Renvert, S. (2014). Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis: Pathogens in Peri-Implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(6), 783–793. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>

Petković, A. B., Matic, S. M., Stamatović, N. V., Vojvodić, D. V., Todorović, T. M., Lazić, Z. R., & Kozomara, R. J. (2010). Proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and chemokines (IL-8 and MIP-1 α) as markers of peri-implant tissue condition. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 39(5), 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.01.014>

Rahnama, M., Czupkałło, Ł., Kozicka-Czupkałło, M., & Łobacz, M. (2014). Gingival Crevicular Fluid – Composition and Clinical Importance in Gingivitis and Periodontitis. *Polish Journal of Public Health*, 124(2), 96–98. <https://doi.org/10.2478/pjph-2014-0022>

Ramanauskaitė, A., Becker, K., & Schwarz, F. (2018). Clinical characteristics of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 29(6), 551–556. <https://doi.org/10.1111/clr.13152>

Renvert, S., Persson, G. R., Pirih, F. Q., & Camargo, P. M. (2018). Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations: Diagnostic criteria of peri-implant health and diseases. *Journal of Periodontology*, 89(1), S304–S312. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0588>

Sakallıoğlu, U., Lütüoğlu, M., Sakallıoğlu, E. E., Sert, S., & Ceylan, G. (2011). Osmotic pressure of periimplant sulcular and gingival crevicular fluids: A split-mouth, randomized study of its measurement and clinical significance: Osmotic pressure of periimplant/periodontal sulcular fluid. *Clinical Oral Implants Research*, 22(7), 706–710. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02044.x>

Salcetti, J. M., Moriarty, J. D., Cooper, L. F., Smith, F. W., Collins, J. G., Socransky, S. S., & Offenbacher, S. (1997). The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 12(1), 32–42.

Sanz, M., Chapple, I. L., & on behalf of Working Group 4 of the VIII European Workshop on Periodontology (2012). Clinical research on peri-implant diseases: Consensus report of Working Group 4. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(12), 202–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01837.x>

Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J., & Takayanagi, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine*, 203(12), 2673–2682. <https://doi.org/10.1084/jem.20061775>

Schett, G. (2011). Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone: cytokine effects on bone. *European Journal of Clinical Investigation*, 41(12), 1361–1366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>

Schwarz, F., Becker, K., Sahm, N., Horstkemper, T., Rousi, K., & Becker, J. (2017). The prevalence of peri-implant diseases for two-piece implants with an internal tube-in-tube connection: A cross-sectional analysis of 512 implants. *Clinical Oral Implants Research*, 28(1), 24–28. <https://doi.org/10.1111/clr.12609>

Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H.-L. (2018). Peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), S246–S266. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>

Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>

Shimchuk, A. A., Weinstein, B. F., & Daubert, D. M. (2021). The impact of a change in classification criteria on the prevalence of peri-implantitis: A cross-sectional analysis. *Journal of Periodontology*, 92(9), 1339–1346. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0566>

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

Tatli, U., Damlar, İ., Erdoğan, Ö., & Esen, E. (2013). Effects of smoking on periimplant health status and il-1 β , tn α , and pge2 levels in periimplant crevicular fluid: A cross-sectional study on well-maintained implant recall patients. *Implant Dentistry*, 22(5), 519–524. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31829a1718>

The American Academy of Periodontology. (2013). Peri-Implant Mucositis and Peri-Implantitis: A Current Understanding of Their Diagnoses and Clinical Implications. *Journal of Periodontology*, 84(4), 436–443. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.134001>

Tie, L., Xiao, H., Wu, D., Yang, Y., & Wang, P. (2021). A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(7), 1015–1017. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00539-7>

Vieira, A. E., Moura, C. C. G., de Souza, M. A., Zanetta-Barbosa, D., & Dechichi, P. (2013). Would Nitric Oxide be an Effective Marker for Earlier Stages of Peri-Implant Disease? An Analysis in Human Peri-Implant Sulcular Fluid. *Journal of Oral Implantology*, 39(1), 37–43. <https://doi.org/10.1563/AID-JOI-D-11-00158>

Wang, H.-L., Garaicoa-Pazmino, C., Collins, A., Ong, H.-S., Chudri, R., & Giannobile, W. V. (2016). Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 27(9), 1129–1136. <https://doi.org/10.1111/clr.12708>

Wassall, R. R., & Preshaw, P. M. (2016). Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontology 2000*, 70(1), 65–79. <https://doi.org/10.1111/prd.12109>

Waterboer, T., Sehr, P., & Pawlita, M. (2006). Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. *Journal of Immunological Methods*, 309(1–2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.11.008>

Weinstein, E., Mandel, I. D., Salkind, A., Oshrain, H. I., & Pappas, G. D. (1967). Studies on gingival fluid. *Periodontics*, 5, 161–166.

Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., & Graves, D. T. (2016). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Frontiers of oral biology*, 18, 9–16. <https://doi.org/10.1159/000351895>

Yalçın, S., Başeğmez, C., Mijiritsky, E., Yalçın, F., Işık, G., & Onan, U. (2005). Detection of Implant Crevicular Fluid Prostaglandin E2 Levels for the Assessment of Peri-implant Health: A Pilot Study. *Implant Dentistry*, 14(2), 194–200. <https://doi.org/10.1097/01.id.0000165027.30821.90>

Zani, S. R., Moss, K., Shibli, J. A., Teixeira, E. R., Oliveira Mairink, R., Onuma, T., Feres, M., & Teles, R. P. (2016). Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(10), 825–832. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12586>

Zetterqvist, L., Feldman, S., Rotter, B., Vincenzi, G., Wennström, J. L., Chierico, A., Stach, R. M., & Kenealy, J. N. (2010). A Prospective, Multicenter, Randomized-Controlled 5-Year Study of Hybrid and Fully Etched Implants for the Incidence of Peri-Implantitis. *Journal of Periodontology*, 81(4), 493–501. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090492>

Zitzmann, N. U., & Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>

