



## Efeito da liberação de partículas metálicas de implantes dentais na resposta imune do hospedeiro.

Palavras-Chave: periodontite, implante, titânio

Autores(as):

Karen Victória Gomes dos Santos, FOP - UNICAMP  
Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Renato Corrêa Viana Casarin, FOP - UNICAMP  
Gabriela Martin Bonilha, FOP - UNICAMP

### INTRODUÇÃO

A degradação de ligas metálicas no ambiente bucal pode ocorrer de forma química ou mecânica, tendo como principais causas, as cargas mastigatórias e as diferentes substâncias químicas presentes na saliva e outros fluidos. Tendo como objetivo observar os efeitos desses íons metálicos livres no tecido peri-implantar, principalmente sobre as respostas imunes em diferentes pacientes, o presente projeto visa determinar uma relação entre as diferentes concentrações de titânio e as respostas dos respectivos hospedeiros. Quarenta participantes diagnosticados com periodontite Grau B/C, estágio 3-4 ou com peri-implantite serão selecionados (n= 20 em cada grupo) para participar do estudo. Serão alocados em dois grupos, de acordo com o diagnóstico de sua doença (grupo periodontite e grupo peri-implantite). Através de uma sonda periodontal milimetrada serão avaliados os parâmetros clínicos iniciais dos pacientes com periodontite e peri-implantite. Será então, realizada a coleta do fluido gengival através de cones de papel estéreis para análise dos marcadores inflamatórios de cada grupo (equipamento Luminex/MAGpix) e, a partir do fluido crevicular, será analisada a concentração de Titânio local. Os dados serão analisados estatisticamente ( $p < 0.05$ ).

### METODOLOGIA

#### 1. Desenho do estudo e seleção dos pacientes:

O presente projeto foi delineado como um estudo transversal, pareado para características demográficas e clínicas, para avaliar características imunológicas de sítios com peri-implantite. Assim, foram selecionados:

**Grupo Peri:** 20 sujeitos com Peri-implantite (Berglundh et al. 2018); presença de sangramento e/ou supuração à sondagem, perda óssea e aumento da profundidade de sondagem em relação a exames prévios.

Foram excluídos sujeitos/sítios com as características abaixo:

*Critérios de Exclusão gerais:* alteração sistêmica ou uso de medicamentos - 6 meses; grávidas e

lactantes; tratamento periodontal/peri-implantar nos 6 meses anteriores ao estudo.

*Critérios de exclusão específicos:* Grupo Peri: Implantes reabilitados com próteses cimentadas apresentando excesso de cimento; Próteses parafusadas com falha de adaptação ou perda de torque; Implantes com mobilidade ou trauma oclusal; Implantes com impossibilidade de exame clínico adequado (perfil de emergência inadequado, mal posicionamento, etc).

Todos os sujeitos, após coletas para o presente estudo, receberam tratamento na Clínica de pós-graduação da área de Periodontia.

## **2. Parâmetros clínicos**

Os parâmetros clínicos peri-implantares avaliados foram (Mayer et al. 2020):

- Sangramento à sondagem- SS (avaliado em 6 sítios por implante);
- Índice de placa - IP (Silness & Loe, 1964);
- Profundidade de sondagem Peri-Implantar- PSPI (medida da margem da mucosa até o fundo da bolsa, avaliado em 6 sítios por implante);
- Nível Clínico de Inserção do implante- NICI (medida do pescoço do implante até o fundo da bolsa, clinicamente detectável, em seis sítios por implante).

Todos os parâmetros clínicos foram obtidos utilizando uma sonda periodontal do tipo Carolina do Norte, por um examinador calibrado (MFM).

## **3. Análise dos marcadores inflamatórios**

Para realizar a análise dos marcadores inflamatórios foi feita a coleta do fluido crevicular peri-implantar de todos os indivíduos envolvidos na pesquisa. Durante a coleta do material, o sítio envolvido foi devidamente isolado e seco com rolos de algodão esterilizados. A porção supragengival do biofilme bacteriano foi removida, para então se obter amostras de fluido gengival por meio da colocação de tiras papel (Periopaper, Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA) no interior da interface dente/tecidos periodontais, durante 30 segundos. Foram utilizadas 2 tiras de papel por sítio, para obtenção de adequado volume de fluido periodontal. O volume de fluido coletado foi medido com o Periotron (Periotron 8000, Proflow Inc., Amityville, NY, USA) e as tiras de papel foram, então, colocados em tubos para microcentrifugação (Eppendorf), codificados para cada um dos indivíduos com 150µl de solução tampão fosfato (PBS) e 0,05% de Tween-20. As amostras foram estocadas para posterior análise. Antes da análise, as amostras do fluido foram diluídas em 60µl de tampão proveniente do kit Millipore, submetidas à agitação em vortex por 30 minutos e então centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm. Alíquotas de cada amostra de fluido gengival foram submetidas a análises para detecção de IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- e INF- pela tecnologia Luminex/MAGpix, a qual permite determinar a presença e quantificar de forma absoluta a concentração de diferentes marcadores em uma mesma amostra. Para tanto, as análises foram realizadas em placas de 96 poços, com o auxílio de painéis de alta sensibilidade (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, os poços foram lavados com tampão de lavagem e aspirados. Microesferas exclusivas conjugadas a anticorpos monoclonais contra os diferentes analíticos a serem analisados foram adicionadas nos poços (as microesferas de poliestireno são coradas com proporções precisas de dois fluoróforos, criando um “código de cores” para posterior identificação pelo instrumento Luminex/MAGpix). Amostras e reagentes para a

curva padrão foram pipetados nos poços e incubados overnight a 4°C. Os poços foram, então, lavados e uma mistura de anticorpos secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, a detecção final foi feita através de um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex/MAGpix movimentou estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detectou (classificou) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantificou o sinal de reporte em cada microesfera. A concentração de cada analítico foi expressa em pg/l. Amostras com quantificação abaixo do limite de detecção da análise foram registradas como “zero” e amostras acima do limite de quantificação da curva padrão foram registradas com valor igual ao maior valor da curva.

### 3. Determinação da concentração de titânio

Para a análise da concentração de Titânio(<sup>22</sup>Ti) no ambiente peri-implantar, serão coletadas amostras do fluido crevicular e avaliado por meio de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), no CENA-USP, utilizando o equipamento multi-usuário ICP-MS Agilent 7500ce, com cela de reação e colisão, do tipo octopolo, adquirido com verba FAPESP. Serão utilizadas as mesmas amostras utilizadas para a análise de citocinas, uma vez que para a análise destas utiliza apenas 25 uL de cada amostra, restando material suficiente para a análise dos metais. Ressaltamos que a metodologia a seguir foi determinada após estudo piloto prévio, o qual confirmou a possibilidade de avaliar a concentração de Ti no fluido.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Concentração de moléculas subgingivais no grupo peri-implantite.

	Peri-implantitis	p-value
Age (years)	48.1±7.22	0,008
Gender (%F)	73	
PD	2.4±0.14	
CAL	2.7±0.9	
PI	38.94±12.75	0,46
BoP	28.3±9.4	0,08
LPS	25,41±7,4	0,78
LTA	862,25±255,74	0,4
IFN-γ	11,84±6,15	0,69
IL-10	22,42±10,76	0,32
IL-17	16,02±5,04	0,04
IL-1β	24,24±16,24	0,0001
IL-4	15,37±17,24	0,039
TNF-α	20,76±7,89	0,17
MMP2	4955,92±982,74	0,003
MMP9	353517,48±260475,64	0,001

**Tabela 2.** Resultado da análise da quantificação de partículas de titânio nas amostras do grupo Peri-implantite.

Amostras	Ti(mg/L)
1	0,0009
2	0,0239
3	0,019

4	0,0005
5	0,0001
6	0,027
7	0,023
8	0,0206
9	0,0208
10	0,0003
11	0,0001
12	0,0158
13	0,0362
14	0,0111
15	0
16	0,021
17	0
18	0,037
19	0,0009
20	0,0001
Média (DP)	0,013±0,012

Quando comparado com ambientes peri-implantares saudáveis, sítios doentes apresentaram maiores quantidades de titânio dissolvido no biofilme submucoso (Safioti et al. 2017), sendo assim, a partir destes achados, podemos inferir que, quando há a liberação de titânio nos tecidos, há uma contribuição para a patogênese de doenças peri-implantares. Estudos anteriores demonstraram notável relação da liberação de partículas de titânio com efeitos pró-inflamatórios e tóxicos em ambiente peri-implantar (Kheder et al. 2021), a exemplo de um processo no qual, concentrações de partículas de titânio parecem estimular respostas pró-inflamatórias da imunidade do paciente com um aumento fortemente relacionado à citocina IL-17 (Severino et al. 2011). Além disso, esta relação da liberação de partículas de titânio com uma exacerbação das respostas pró-inflamatórias já foi investigada em um trabalho de Noronha e colaboradores em 2017. Neste estudo, os autores indicaram que a presença destas partículas de titânio provoca uma ativação do sistema imunológico, gerando uma resposta pró-inflamatória em macrófagos, linfócitos T e monócitos, o que corrobora com os achados de nosso projeto. Durante esta ativação, há a liberação de citocinas inflamatórias, incluindo o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), prostaglandina e TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. O aumento dessas citocinas mencionadas foi grandemente observado no presente estudo.

## CONCLUSÕES

É notável que concentrações de partículas de titânio impactam diretamente na resposta imune-inflamatória do paciente, promovendo maiores respostas pró-inflamatórias, o que exacerba o estabelecimento e a progressão de doenças inflamatórias peri-implantares. Consequentemente, essas partículas em nichos peri-implantares podem representar um fator de risco ambiental para periimplantite (Fretwurst et al. 2018; Wheelis et al. 2018; Daubert et al. 2019). Diferenças imunológicas e microbiológicas, bem como transcriptômicas são específicas do nicho peri-implantar e podem estar associadas à fatores locais, como a presença de partículas de titânio- que se mostrou capaz de modular a

concentração das citocinas inflamatórias. Dessa forma, todas estas características distintas explicam as diferenças fenotípicas dessa lesão e podem, no futuro, guiar novos conceitos de materiais, prevenção e tratamento.

## **BIBLIOGRAFIA**

-Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? J Clin Periodontol 2011.

-Mayer Y, Ginesin O, Horwitz J. A nonsurgical treatment of peri-implantitis using mechanic, antiseptic and anti-inflammatory treatment: 1 year follow-up. Clin Exp Dent Res. 2020 Mar 17.

-Safioti LM, Kotsakis GA, Pozhitkov AE, Chung WO, Daubert DM. Increased levels of dissolved titanium are associated with peri-implantitis—a cross-sectional study. J Periodontol 2017;88(5):436–42.

-Kheder W, Al Kawas S, Khalaf K, Samsudin AR. Impact of tribocorrosion and titanium particles release on dental implant complications - A narrative review. Jpn Dent Sci Rev. 2021 Nov;57:182-189. doi: 10.1016/j.jdsr.2021.09.001.

-Severino, Viviane O., Marcelo H. Napimoga, and Sanivia A. de Lima Pereira. "Expression of IL-6, IL-10, IL-17 and IL-8 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis." Archives of oral biology 56.8 (2011): 823-828.

-Fretwurst T, Nelson K, Tarnow DP, Wang HL, Giannobile WV. 2018. Is metal particle release associated with peri-implant bone destruction? An emerging concept. J Dent Res. 97(3):259–265.

-Wheelis SE, Montano-Figueroa AG, QuevedoLopez M, Rodrigues DC. 2018. Effects of titanium oxide surface properties on boneforming and soft tissue-forming cells. Clin Implant Dent Relat Res. 20(5):838–847.

-Daubert DM, Pozhitkov AE, Safioti LM, Kotsakis GA. 2019. Association of global DNA methylation to titanium and peri-implantitis: a case-control study. JDR Clin Trans Res. 4(3):284–291.