

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JULIANA BARBOSA DE FARIA

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR EM PACIENTES
COM GENGIVITE, PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE:
UM ESTUDO LONGITUDINAL DE 1 ANO**

UBERABA, MG

2021

JULIANA BARBOSA DE FARIA

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR EM PACIENTES
COM GENGIVITE, PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE:
UM ESTUDO LONGITUDINAL DE 1 ANO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Sanivia Aparecida Lima Pereira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Uberaba, MG

2021

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F234a Faria, Juliana Barbosa de
Avaliação imunológica do fluido crevicular em pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite: um estudo longitudinal de 1 ano / Juliana Barbosa de Faria. -- 2021.
133 f. : il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021

Orientadora: Prof^a Dr^a Sanívia Aparecida de Lima Pereira

Coorientadora: Prof^a Dr^a Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

1. Doenças periodontais. 2. Citocinas. 3. Líquido do sulco gengival. 4. Peri-implantite. I. Pereira, Sanívia Aparecida de Lima. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.314

JULIANA BARBOSA DE FARIA

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR EM PACIENTES COM
GENGIVITE, PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE:
UM ESTUDO LONGITUDINAL DE 1 ANO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Sanivia Aparecida Lima Pereira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

Uberaba, 2021.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Sanivia Aparecida de Lima Pereira - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Prof. Dr. Luís Henrique Borges
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri
Universidade de Uberaba – UNIUBE

Prof. Dr. Douglas Reis Abdalla
Faculdade de Talentos Humanos / UNIBRASÍLIA - FACTHUS

Comece de onde você está. Use o que você tiver. Faça o que você puder.

(Arthur Ashe)

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À toda minha família, de maneira particular, a meus pais Joana Aparecida Barbosa de Faria e Alfredo Júlio de Faria.

Ao meu filho Mateus Vasconcelos Faria que é a base da minha vida.

Ao meu esposo Helton Vasconcelos Faria pelo companheirismo e pelo amor constante.

Ao meu irmão Alfredo Júlio de Faria Jr. pela amizade, companheirismo e apoio de sempre.

Ao meu tio Marcos Barbosa de Freitas pelo companheirismo e por cuidar tão bem da minha família.

À minha amiga Elaine Rodrigues que esteve segurando a minha mão durante todo este tempo do Doutorado.

À minha co-orientadora Profa. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues pelas orientações, apoio, ensinamentos e amizade.

À minha orientadora Profa. Dra. Sanivia Aparecida de Lima Pereira a quem agradeço pela amizade, acolhimento e apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço em primeiro lugar, pelo que sou e pelo que adquiri durante a minha caminhada.

Aos meus pais queridos Joana Aparecida Barbosa de Faria e Alfredo Júlio de Faria que são os responsáveis por tudo que sou hoje. Pela semente plantada e que foi dando frutos.

Ao meu filho Mateus, meu filho querido, menino lindo e inteligente, que alegra meus dias e que dá cor e sentido à minha vida.

Ao meu esposo Helton Vasconcelos Faria pelo companheirismo, pelo amor e carinho de sempre.

Ao Alfredo Jr., meu irmão querido, amigo e companheiro sempre presente em todas as ocasiões e sempre pronto a ajudar no que eu precisar.

A minha afilhada e sobrinha Carolina, menina linda, que me dá muitas alegrias e que veio como um presente de Deus para nossa família. À Conceição Souza, Edmar e Thaís Souza por nos dar a amizade e o carinho de uma família amiga.

Ao meu tio Marcos Barbosa de Freitas por cuidar tão bem dos meus pais nos momentos em que eu não estava presente. Agradeço pelo companheirismo e amizade de sempre.

À minha amiga Elaine Rodrigues que foi uma peça importante para o meu crescimento pessoal e profissional. E como eu cresci! Agradeço a amizade de sempre!

A todos os meus familiares que rezaram por mim e torceram para o meu sucesso.

Às minhas amigas e integrantes da nossa equipe, Taíssa Cássia de Souza Furtado, Bárbara Bellocchio Bertoldo, Eleonora de Paula Amaral, Andrea Grou Jorge, Camilla Beatriz da Silva, Fabiane Minin Andrade e Cleisla Caroline Maria Reis, pelo apoio e amizade durante a realização de minhas atividades para concluir o projeto de Doutorado. Agradeço pelos alegres momentos que passamos juntas!

Ao meu amigo, professor Dr. Douglas Reis Abdalla, que me auxiliou durante a escrita, análise dos resultados e revisão do Artigo referente a minha Tese de Doutorado. Muito obrigada pelo auxílio e apoio de sempre!

Aos meus parceiros, Dra. Thaís Soares Farnesi de Assunção, ao professor Dr. Marcos Vinícius da Silva e Dra. Ana Carolina de Moraes Oliveira, pela colaboração nos ensaios de ELISA.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e aos órgãos de fomento, principalmente à CAPES, pelo apoio financeiro e acadêmico. Agradeço à coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UFTM, Dra. Juliana Reis

Machado e Silva, pelas oportunidades, carinho, apoio de sempre e por acreditar sempre em meu trabalho. Agradeço aos colegas discentes e docentes da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) que foram os principais responsáveis por minha formação e que me fizeram chegar em patamares que eu nunca imaginei alcançar. Meu muito obrigada!

À Universidade de Uberaba, juntamente com os docentes e colaboradores desta Instituição, principalmente ao Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia Dr. Cesar Penazzo Lepri e à minha orientadora do Mestrado em Odontologia, professora Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, pelo acolhimento desde quando cheguei à Uberaba, desde quando começou minha experiência acadêmica, concedendo minha primeira bolsa de estudos da CAPES. Agradeço a todos por abrirem as portas para que eu pudesse pôr em prática meus conhecimentos adquiridos durante minha experiência profissional. Agradeço de coração!

Aos coordenadores professor Dr. Luís Henrique Borges e ao professor Alan Garcia Essado, discentes e docentes, do Curso de Pós-Graduação em Implantodontia da Policlínica Getúlio Vargas - Universidade de Uberaba (UNIUBE), pela amizade formada e apoio nas coletas das amostras.

Aos coordenadores e docentes do Curso de Direito da Universidade de Uberaba, em especial à Diretora Dra. Andrea Queiroz Fabri e Vice-Diretor: Dr. Eduardo de Carvalho Azanki Abdu e também à Assistente Pedagógica Keidi Ribeiro, pela amizade, apoio para que eu pudesse alcançar meus objetivos, para que eu subisse degraus maiores e por acreditarem em meu trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues e ao professor Dr. Virmondes Rodrigues Jr. que não mediram esforços para me dar apoio, abriram as portas da UNIUBE e UFTM para que eu pudesse aprender ainda mais. Agradeço as orientações, amizade e parceria de sempre!

À minha orientadora Profa. Dra. Sanivia Aparecida de Lima Pereira a quem agradeço pelas orientações, acolhimento, torcida, pela forte amizade e carinho. Agradeço pela confiança depositada em meu trabalho, cedendo espaço nas salas de aula da UNIUBE e UFTM para que eu pudesse aprender e compartilhar conhecimentos. Agradeço por construirmos juntas este trabalho, meu currículo e minha nova história. Seus conselhos e principalmente seus ensinamentos sempre foram fatores importantes durante o período de construção desse trabalho. Para sempre serei grata à sua amizade e cultivarei intenso respeito e admiração.

Eu ainda continuo aprendendo muito com todos vocês! Vocês sempre estarão em minhas orações!

Muito Obrigada! Foram momentos incríveis e inesquecíveis!

APOIO FINANCEIRO

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado graças ao apoio recebido do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia e Programa de Iniciação Científica da Universidade de Uberaba (PIBIC-UNIUBE- 2015/004); pelo Cefores/Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). As fontes de financiamento não tiveram envolvimento no desenho do estudo, na coleta, análise e interpretação dos dados, na redação e na decisão de submeter o manuscrito para publicação.

RESUMO

RESUMO

Introdução: As doenças periodontais e peri-implantares podem levar à perda de dentes ou de implantes, comprometendo a função e estética. **Objetivo:** Avaliar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival (FCG) e peri-implantar (FCPI) de pacientes com gengivite e periodontite, antes da instalação do implante, e de pacientes com peri-implantite, um ano após a instalação do implante. **Material e Métodos:** Quarenta e nove amostras de FCG e FCPI foram coletadas entre março de 2018 a março de 2019. Os pacientes foram classificados de acordo com a situação periodontal ou peri-implantar: pacientes com gengivite (n=7), pacientes com periodontite (n=14), pacientes com peri-implantite (n=4) e pacientes saudáveis (n=24). Desses 49 pacientes, foi coletado fluido crevicular antes da instalação do implante (n=8) e um ano após a instalação do implante (n=8). Nesse grupo (n=8) os pacientes foram classificados de acordo com a situação periodontal: pacientes com gengivite (n=4), pacientes com periodontite (n=3), pacientes com peri-implantite (n=1). O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi usado para avaliar os níveis de citocinas no fluido crevicular. **Resultados:** Pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite apresentaram maiores concentrações de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 quando comparados ao grupo controle. Em geral, os níveis de IL-12 e IL-15 aumentaram quando comparados aos momentos antes e após a instalação do implante. Também houve aumento na concentração de IL-18 nos voluntários do grupo controle após a instalação do implante. **Conclusão:** Os resultados e a metodologia deste estudo mostraram que não houve diferença na síntese de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 em indivíduos saudáveis ou com lesão periodontal. Porém, houve aumento das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 um ano após a instalação do implante, o que estaria aumentando a atividade inflamatória na peri-implantite.

Palavras-chave: Citocinas; Doenças Periodontais; Líquido do Sulco Gengival; Peri-implantite.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Periodontal and peri-implant diseases can lead to the loss of teeth or implants, compromising both function and appearance. **Objective:** To assess the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) and peri-implant crevicular fluid (PICF) in patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis before and one year after implant installation. **Material and Methods:** Forty-nine samples of GCF and PICF were collected from March 2018 to March 2019. The patients were classified: patients with gingivitis (n=7), patients with periodontitis (n=14), patients with peri-implantitis (n=4) and healthy patients (n=24). The crevicular fluid from the 49 patients was collected before implant installation (n=8) and one year after implant placement (n=8). In this group (n=8) the patients were classified according to their periodontal situation: patients with gingivitis (n=4), patients with periodontitis (n=3), patients with peri-implantitis (n=1). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to evaluate the levels of cytokines in crevicular fluid. **Results:** Patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis showed higher concentrations of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 when compared with control group. In general, the levels of IL-12 and IL-15 increased when compared to the moments before and after implant installation. There was also an increase in the concentration of IL-18 in the control group volunteers after implant installation. **Conclusion:** The results and methodology of this study showed that there was no difference in the synthesis of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in healthy individuals or in those with periodontal injuries. However, there was an increase in the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 one year after implant installation, which would be increasing the inflammatory activity in peri-implantitis.

Keywords: Cytokines; Periodontal diseases; Gingival Crevicular Fluid; Peri-Implantitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Relação entre IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 (Fonte: própria autoria). Created by BioRender.com.	70
Figura 2: Representação em Heat map das citocinas IL-12, IL-15, IL-18 E IL-32, entre os voluntários dos grupos experimentais	74
Figura 3: Representação das dosagens de citocinas comparando os momentos de pré implante e pós implante.	75
Figura 4: Representação das dosagens de citocinas comparando os momentos de pré implante e pós implante, entre os voluntários controle e que possuíam lesão (gengivite e/ou periodontite)..	76
Figura 5: Representação em Heat map das citocinas IL-12, IL-15, IL-18 E IL-32 entre os momentos de pré implante e pós implante, entre os voluntários controle e que possuíam lesão (gengivite e/ou periodontite)	76

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação da dosagem de citocinas entre os pacientes do grupo controle, com gengivite, periodontite e peri-implantite.....	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs: Antigen-presenting cells (Células apresentadoras de antígenos)
- CTLs: Cytotoxic T lymphocytes (Linfócitos T citotóxicos)
- CCL5: C-C chemokine ligand 5 (Ligante 5 de quimiocina CC)
- DP: Desvio padrão
- EBI3: Epstein-Barr virus-induced gene 3 (Gene 3 induzido pelo Vírus Epstein-Barr)
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio Enzima-ligado da Imunoabsorção)
- FCG: Fluido crevicular gengival
- FCPI: Fluido crevicular peri-implantar
- GCF: gingival crevicular fluid
- PICF: peri-implant crevicular fluid
- GM-CSF: Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
- GNLY: Granulysin (Granulisina)
- IFN- γ : Interferon-gamma
- IL: Interleukin
- IL-11R α -gp130: IL-11R receptor alpha (IL-11R α) and the signal transducing subunit β (gp130) (IL-11R receptor alfa e a transdução de sinal subunidade β)
- IL-12: Interleukin 12 (Interleucina 12)
- IL-15: Interleukin 15 (Interleucina 15)
- IL-18: Interleukin 18 (Interleucina 18)
- IL-32: Interleukin 32 (Interleucina 32)
- JAK/STAT3: Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 (Janus quinase 1 - transdutor de sinal e ativador da transcrição 3)
- LPS: Lipopolissacarídeo
- MB: Marginal bleeding (Sangramento marginal)
- MCP-1: Monocyte chemotactic protein-1
- MIP2: Macrophage inflammatory protein 2
- MNPs: Mononuclear Phagocytes (Fagócitos mononucleares)
- NK: Natural killer
- OPG: Osteoprotegerin (Osteoprotegerina)
- PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
- PICF: Peri-implant Crevicular Fluid (Fluido crevicular peri-implantar)

PD: Probing Depth (Profundidade de sondagem)

PCR: C-Reactive Protein (Proteína C Reativa)

TBX21: T-Box Transcription Factor 21 (T-box fator de transcrição)

TGF- β : Transforming growth factor beta (Fator de crescimento transformador beta)

TNF α : Tumour necrosis factor alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

TPs: Total proteins (Proteínas totais)

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

@ - Arroba

© - Copyright

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1 Implantes dentários e tecidos peri-implantares	32
2.2 Doenças periodontais.....	36
2.2.1 Gengivite e Periodontite	37
2.2.2 Biofilme e espécies microbianas	38
2.2.3 Patogênese	39
2.2.4 Diagnóstico Clínico da Doença Periodontal.....	41
2.3 Doenças peri-implantares: Mucosite e Peri-implantite	43
2.3.1 Saúde Peri-implantar	43
2.3.2 Mucosite	44
2.3.3 Peri-implantite	45
2.3.4 Patogênese e diagnóstico da Peri-implantite	45
2.4 Relação entre doença periodontal e doença peri-implantar.....	48
2.5 Citocinas nas doenças periodontais e peri-implantares	49
2.5.1 Citocinas nas doenças periodontais	49
2.5.2 Citocinas nas doenças peri-implantares.....	53
2.5.3 IL-12	54
2.5.4 IL-15	55
2.5.5 IL-18	56
2.5.6 IL-32	57
3 JUSTIFICATIVA	61
4 OBJETIVOS	63
4.1 OBJETIVOS GERAL	63
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5 RESULTADOS	65
5.1 Artigo.....	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A - ANAMNESE	108
APÊNDICE B - TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	110
ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	114

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO: IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF THE CREVICULAR FLUID IN PATIENTS WITH GINGIVITIS, PERIODONTITIS, AND PERI-IMPLANTITIS: A 1-YEAR CROSS-SECTIONAL STUDY	121
--	------------

INTRODUÇÃO

1 1 INTRODUÇÃO

2 As doenças periodontais correspondem a um processo inflamatório que se inicia na
3 gengiva em resposta a antígenos bacterianos da placa dentária que se acumula ao longo da
4 margem gengival. A placa é um biofilme constituído por bactérias, proteínas salivares e células
5 epiteliais descamadas. As bactérias desencadeiam a produção de citocinas e quimiocinas no
6 epitélio gengival, resultando na expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade
7 dos capilares gengivais e quimiotaxia de neutrófilos através do epitélio juncional para o sulco
8 gengival (SILVA et al, 2015). A manifestação inicial da doença periodontal é a gengivite,
9 caracterizada por hiperemia, edema, recessão e sangramento gengival. Se não tratada
10 precocemente, a gengivite pode evoluir para periodontite, caracterizada por perda de inserção
11 dos tecidos periodontais que suportam e protegem o elemento dental. Portanto, a periodontite
12 afeta estruturas mais profundas, causando reabsorção das fibras colágenas do ligamento
13 periodontal, reabsorção do osso alveolar, abscessos, aumento da profundidade do sulco
14 gengival, maior mobilidade dentária e perda do elemento dental (ZHANG et al., 2020).

15 A progressão da doença periodontal não depende apenas das bactérias, mas da resposta
16 imunológica. Portanto, a resposta imune do hospedeiro desempenha papel fundamental no
17 equilíbrio entre a destruição e a reparação do tecido periodontal. Por esse motivo as pesquisas
18 recentes realizadas em doenças periodontais têm focado nos mecanismos imunológicos
19 envolvidos nessas doenças (ZHANG et al, 2020).

20 Por outro lado, as bactérias presentes no biofilme podem também provocar inflamação
21 reversível na mucosa que circunda os implantes dentários (mucosite periimplantar) e lesão
22 irreversível no tecido de sustentação desses implantes (periimplantite) (RINKE et al., 2020),
23 podendo desencadear sangramento marginal, mobilidade e perda do elemento dental
24 implantado, comprometendo a estética e a função. De forma semelhante às doenças
25 periodontais, as citocinas liberadas no local também contribuem para a progressão dessas
26 doenças (ALI et al, 2021). No entanto essas doenças periimplantares ainda não são totalmente
27 compreendidas, sendo que recentemente tem surgido desafios ao consenso sobre as etiologias
28 e patogêneses especialmente em comparação com a periodontite (KALSI, MORENO, &
29 PETRIDIS, 2021).

30 No entanto, a instalação dos implantes dentários traz grandes benefícios para os
31 pacientes e tem contribuído para a redução do número de pacientes desdentados em todo o
32 mundo. Assim, o tratamento do edentulismo com implantes dentários é um tratamento de rotina
33 na prática odontológica diária e está se tornando cada vez mais difundido ao longo dos anos
34 (KORMAS et al, 2020). Embora tenha ocorrido um grande avanço na área desses implantes
35 nos últimos anos, aumentaram também o número dos insucessos relacionados à inflamação do
36 tecido periimplantar. No estudo de Rinke et al., (2020) foi detectada uma prevalência de 52%
37 para mucosite periimplantar e 18% para periimplantite baseada nos pacientes do estudo.

38 Dessa forma crescem o número de estudos nessa área a fim de compreender o
39 mecanismo imunológico envolvido na progressão dessas doenças, uma vez que a avaliação dos
40 níveis de citocinas inflamatórias nas doenças periodontais e periimplantares pode permitir a
41 identificação da doença ativa, colaborando para o diagnóstico e tratamento precoces (ALI et al,
42 2021).

43 Portanto, o presente estudo foi realizado a fim de contribuir para a compreensão da
44 lesão tecidual na gengivite, periodontite, e periimplantite partindo do princípio de que as
45 interleucinas (IL) e outras citocinas estimulam células de várias linhagens e estágios de
46 diferenciação. Mais notavelmente, Interleucina 1 (IL-1), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-
47 alfa), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 15 (IL-15), Interleucina 17 (IL-17), Interleucina 18 (IL-
48 18), Interleucina 21 (IL-21), Interleucina 25 (IL-25), Interleucina 31 (IL-31) e Interleucina 32
49 (IL- 32) contribuem em conjunto para eventos fisiopatológicos como morte celular, inflamação,
50 alergia e autoimunidade. A Interleucina 32 (IL-32) é uma citocina inflamatória produzida por
51 linfócitos ativados por mitógenos, células epiteliais ativadas, por interferon gama e por células
52 NK ativadas por Interleucina 12 (IL-12), Intelucina 18 (IL-18) e Interleucina 32 (IL-32). Isso
53 induz a produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa), Interleucina 1beta (IL-1beta),
54 Interleucina 6 (IL-6) e o Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C (CCL2) envolvidos em
55 várias doenças inflamatórias. Além disso, a Interleucina 32 (IL-32) ativa o metabolismo do
56 ácido araquidônico nas células mononucleares do sangue periférico, estimulando a liberação de
57 prostaglandinas (CONTI et al, 2007).

58 Sendo assim, embora existam estudos que avaliaram a resposta imunológica nos
59 tecidos periodontais e periimplantares (ALI et al, 2021), este é o primeiro estudo a comparar
60 simultaneamente os níveis de IL-12, IL- 15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular de pacientes

61 com gengivite, periodontite e periimplantite. Também, o primeiro estudo a comparar todas
62 essas citocinas simultaneamente, antes e após um ano da instalação dos implantes dentários.

63 Como todos os mecanismos imunológicos envolvidos nessas doenças ainda não são
64 compreendidos, os resultados do presente estudo nos permitirão trazer novos conhecimentos
65 para um melhor entendimento da patogênese das doenças periodontais e peri-implantares. Este
66 estudo pode contribuir para uma melhor qualidade de vida para as pessoas, visto que a
67 compreensão dos mecanismos dessas doenças pode colaborar na adoção de medidas profiláticas
68 e terapêuticas a fim de prevenir a perda de dentes e implantes dentários. Saber da importância
69 dos dentes para a estética, mastigação e fonética é suficiente para justificar a necessidade de se
70 compreender a patogênese dessas doenças.

71 Por ser a gengivite, a periodontite e a peri-implantite doenças inflamatórias,
72 levantamos a hipótese de que nesses pacientes exista aumento da expressão de IL-12, IL-15,
73 IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival e no fluido crevicular peri-implantar de pacientes
74 submetidos a implantes dentários.

75 Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32
76 no fluido crevicular gengival (FCG) de pacientes com gengivite e periodontite, antes da
77 instalação do implante, e no fluido crevicular peri-implantar (FCPI) de pacientes com peri-
78 implantite, um ano após a instalação do implante.

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPLANTES DENTÁRIOS E TECIDOS PERI-IMPLANTARES

Com o passar do tempo o avanço técnico-científico da Odontologia, em especial no campo da reabilitação bucal, vem restaurando a estabilidade oclusal e, por conseguinte, promovendo harmonia oral de forma plena com os implantes osseointegráveis, devolvendo saúde aos pacientes que por motivos diversos sofreram danos à sua dentição (DONATH et al., 2003).

A terapia com implantes é uma ferramenta confiável e previsível para a reabilitação dentária que requer múltiplos fatores para a manutenção do sucesso e da estética do tratamento a longo prazo (PAN *et al.*, 2019). Os implantes dentários tornaram-se um procedimento padrão para a substituição de um dente na zona estética, oferecendo muitas vantagens, mas também desafios para os pacientes (SMEETS *et al.*, 2016).

A instalação de implantes requer não apenas anatomia óssea adequada, mas uma cobertura favorável de tecidos moles e um ambiente oral saudável. A manutenção, dentes e dispositivos protéticos convencionais são essenciais para o sucesso a longo prazo das restaurações implanto-suportadas. Muitos aspectos técnicos da instalação dos implantes contribuem para o sucesso da osseointegração, da seleção do local, técnica cirúrgica e à necessidade de cura (EPHROS; KIM; DeFALCO, 2019).

O implante dentário é um material aloplástico, inserido por meio de uma cirurgia em um rebordo ósseo residual, principalmente como base protética (AMERICAN ACADEMY OF IMPLANT DENTISTRY, 2016). Basicamente, os implantes são constituídos por um parafuso metálico e um pilar, e sobre eles confeccionada uma coroa protética análoga à coroa dentária. Em conjunto, os componentes parafuso e pilar representam uma analogia da raiz dentária. O implante oral é uma inserção cirúrgica de materiais como metais, ligas, cerâmica, polímeros, carbonos e suas combinações nos tecidos duros e moles das partes superior e inferior da mandíbula (PETKOVIĆ-CURCIN *et al.*, 2011). As formas comuns dos implantes são cilíndricas ou cônicas (ESPOSITO; GRUSOVIN; WORTHINGTON, 2014).

Em relação ao tipos de implantes, existem muitos estudos clínicos prospectivos, para avaliar pilares de zircônia e titânio; no entanto, são frequentemente realizados sem controle adequado (LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015; CIONCA; MULLER; MOMBELLI *et al.* 2015).

133 Os implantes de titânio têm sido utilizados para aplicações odontológicas, ortopédicas e outras
134 aplicações médicas desde o início dos anos 80 (STAROVESKI; BREZAK; UDILJAK *et al.*,
135 2015). Embora haja dúvidas sobre a força da zircônia e sua pertinência para suportar carga,
136 profissionais geralmente enfrentam o dilema de escolher entre pilares de zircônia ou titânio ao
137 trabalhar com tecidos. A influência desses materiais na mucosa peri-implantar é ainda não está
138 claro, além de não estar bem estabelecido se oferece um melhor resultado (LINKEVICIUS;
139 VAITELIS, 2015). Além disso, medidas como profundidade de sondagem, sangramento à
140 sondagem e placa devem ser avaliados (LINKEVICIUS; VAITELIS, 2015).

141 Em um estudo anterior avaliou o impacto dos pilares de zircônia ou de titânio no
142 resultado estético no tratamento em termos da cor dos tecidos moles. Esta revisão sistemática
143 recente mostrou uma tendência para os pilares de zircônia evocarem uma melhor resposta de
144 cor e resultados estéticos superiores quando comparados ao titânio (LINKEVICIUS;
145 VAITELIS, 2015).

146 Atuais abordagens sobre como resolver defeitos ósseos usando materiais aloplásticos
147 (titânio, cerâmica) podem envolver importantes limitações, como insucesso da osseointegração
148 no caso de implantes de longo prazo, resposta inflamatória nos locais de implantação e
149 incompatibilidade biomecânica. Esses problemas clínicos determinaram ainda mais pesquisas
150 neste campo da implantodontia, incluindo intervenções sobre características dos implantes em
151 termos de biocompatibilidade (propriedades físico-químicas e bioatividade de superfície) e no
152 comportamento de componentes celulares implicados no processo de osteo-integração
153 (LUCACIU *et al.*, 2015).

154 Várias pesquisas estão focadas no design de novas topografias de superfícies de
155 implantes para otimizar a migração, adesão, proliferação e diferenciação osteoblástica
156 (SMEETS *et al.*, 2016). A topografia do implante dentário pode ser classificada em macro,
157 micro e nanoescala. A macrotopografia de um implante é determinada por sua geometria
158 visível, por exemplo, roscas e design cônico. A escala métrica é de milímetros para
159 micrômetro. Nos últimos anos, o esforço científico se concentrou principalmente na micro e
160 nanogeometria. No entanto, a macrogeometria apropriada combinada com a preparação
161 adequada do furo do implante é a base fundamental do sucesso clínico na implantologia dentária
162 (COELHO *et al.*, 2015).

163 O acúmulo de placa e a qualidade da fixação dos tecidos moles pode desempenhar um
164 papel no grau de inflamação. Foi demonstrado que a zircônia promove *in vitro* maior
165 proliferação de fibroblastos quando comparada ao titânio (NOTHDURFT *et al.*, 2015). Em
166 estudos anteriores foi comprovado que os patógenos periodontais colonizam a superfície do
167 implante após a instalação através das proteínas plasmáticas presentes na película (ZHU; LEE
168 *et al.*, 2016). Caso ocorra alterações na superfície do implante, processos de mucosite e peri-
169 implantite podem ser iniciados; a osseointegração pode ser interrompida e os fenômenos de
170 reabsorção óssea (osteólise) podem levar à perda do implante (STAROVESKI; BREZAK;
171 UDILJAK *et al.*, 2015).

172 Particularmente, no momento da inserção do implante, a superfície do implante pode
173 sofrer alterações em suas estruturas químicas e topográficas, que às vezes são irreversíveis
174 (STAROVESKI; BREZAK; UDILJAK *et al.*, 2015) e também partículas de titânio de
175 diferentes tamanhos e características podem ser liberadas da superfície do implante dentário
176 (SENNA *et al.*, 2015).

177 Superfícies moderadamente rugosas ($S a 2,21 \mu m$) apresentaram mais liberação de
178 titânio até 400 μm da superfície do implante do que superfícies lisas ($S a < 1,43 \mu m$). Sendo
179 assim, são recomendadas análises químicas adicionais nas superfícies do implante para avaliar
180 possíveis alterações químicas e suas consequências biológicas (DEPPE *et al.*, 2018).

181 O sucesso da instalação do implante depende do material do implante, seleção adequada
182 do paciente e indicadores adequados, cuidadosa técnica cirúrgica utilizada e criação de
183 restauração protética funcional e estética (PETKOVIC-CURCIN *et al.*, 2011). Cada material
184 de implante deve ser: biocompatível, bioinerte, biofuncional e bioadesivo (PEROVIĆ J., 2001).

185 Para que haja uma maior sobrevida destes implantes dependerá do ambiente local, bem
186 como de fatores relacionados à oclusão. A taxa de sobrevida de implantes dentários, oito anos
187 após a colocação inicial, é estimada em 97%. Este resultado é independente do tamanho do
188 implante, da qualidade do osso, e da ocorrência de uma cirurgia óssea anterior
189 (BUSENLECHNER *et al.*, 2014). Um dos critérios para avaliar o sucesso dos implantes é a
190 estabilidade do nível ósseo marginal (GULATI *et al.*, 2015).

191 Em geral, as taxas de sobrevida a longo prazo dos implantes dentários são
192 excelentes. No entanto, falhas no implante ainda ocorrem em uma pequena quantidade de
193 pacientes. A falha primária do implante devido à osseointegração insuficiente ocorre em 1-2%

194 dos pacientes nos primeiros meses (CHRCANOVIC, ALBREKTSSON, WENNERBER,
195 2014). A falha secundária do implante se desenvolve vários anos após a osseointegração bem-
196 sucedida em cerca de 5% dos pacientes e é geralmente causada por peri-implantite (SMEETS
197 *et al.*, 2014).

198 Mudanças na própria topografia da superfície alteram o crescimento, o metabolismo e
199 a migração, bem como a produção de citocinas e fatores de crescimento das células
200 osteogênicas (SHIBATA; TANIMOTO, 2015). Com isso, avanços adicionais no design da
201 superfície do implante dentário são cruciais para melhorar os resultados de situações clínicas
202 sofisticadas, como no implante imediato após a extração dentária e os protocolos de
203 carregamento precoce e em pacientes com comprometimento ósseo ou capacidade de
204 cicatrização de feridas (GÓMEZ-DE DIEGO *et al.*, 2014).

205 A relação entre implante endósseo e osso ocorre por intermédio de mecanismos como
206 a osseointegração, quando o osso está em contato íntimo com o implante de forma previsível e
207 duradoura para estabelecer uma ancoragem do implante. O termo osseointegração é definido
208 como a direta conexão, estrutural e funcional, entre o tecido ósseo vital e a superfície de um
209 implante capaz de suportar esforços fisiológicos, quando instalados em sua intimidade
210 (MENDES; DAVIES, 2016). A osseointegração compreende uma cascata de complexos
211 mecanismos fisiológicos semelhantes à cicatrização direta das fraturas. A perfuração de uma
212 cavidade de implante se assemelha a um insulto traumático ao tecido ósseo, levando a fases
213 distintas da cicatrização da ferida (VON WILMOWSKY *et al.*, 2014).

214 Para compreender a cicatrização óssea em geral e a osseointegração em particular, é
215 necessário entender a biologia e imunologia do osso. As atividades celulares centrais do osso
216 estão relacionadas à interação entre os osteoblastos formadores de ossos e os osteoclastos que
217 reabsorvem os ossos (TRINDADE *et al.*, 2016). A osseointegração pode ser prejudicada em
218 pacientes com diabetes mellitus, osteoporose e utilização de bifosfonatos ou após
219 radioterapia. Esses pacientes continuam sendo um grande desafio na implantodontia dentária e
220 estimulam a necessidade de modificações bioativas da superfície que aceleram a
221 osseointegração após a inserção do implante (GÓMEZ-DE DIEGO *et al.*, 2014).

222 A posição do implante em relação à crista óssea influencia a reabsorção óssea marginal,
223 principalmente durante o período de cicatrização (CASSETTA *et al.*, 2015). Em teoria, existem
224 três conceitos básicos das vias de cicatrização óssea, dependendo da proximidade física na

225 interface osso-implante (SMEETS *et al.*, 2016). Primeiro, o ajuste apertado ocorre quando o
226 diâmetro da rosca *interna* é igual às dimensões do soquete, levando a potenciais microfissuras
227 do osso circundante. Um alto nível de estabilidade primária é alcançado inicialmente por
228 atrito. No entanto, a estabilidade diminui nas primeiras semanas de cicatrização óssea devido à
229 necrose por compressão do osso vizinho e subsequente remodelação óssea, um processo que
230 foi descrito anteriormente como queda da estabilidade do implante (COELHO *et al.*, 2015).
231 Eventualmente, um novo osso é formado, levando à estabilidade secundária (SMEETS *et al.*,
232 2016). No segundo cenário, o diâmetro da rosca *externa* é o mesmo que o diâmetro da cavidade
233 do implante. O espaço vazio entre as roscas do implante tem sido referido como câmaras de
234 cicatrização (MARIN *et al.*, 2010). Esses compartimentos ossificam através da formação de
235 tecido de granulação e contribuem para a osseointegração na estabilidade secundária (SMEETS
236 *et al.*, 2016). Terceiro, a linha de instrumentação cirúrgica fica bem entre a rosca interna e a
237 externa. Nesse caso, coexistem regiões de remodelação induzidas por câmaras de compressão
238 e cicatrização. A formação da câmara de cura pode ser de importância significativa para os
239 conceitos subsequentes de micro e nanotopografia, discutidos a seguir, uma vez que a migração
240 de células osteogênicas requer um espaço vazio (COELHO *et al.*, 2015).

241

242 **2.2 DOENÇAS PERIODONTAIS**

243 As doenças periodontais são doenças infecciosas caracterizadas pela destruição
244 progressiva do periodonto (tecido de sustentação do dente), que inclui o ligamento periodontal,
245 cimento, osso alveolar e gengiva (DE JONG *et al.*, 2017).

246 A gengivite e a periodontite são as infecções crônicas mais comuns em adultos (FERES
247 *et al.*, 2016) que são causadas por uma microbiota patogênica no biofilme subgengival (FORD;
248 GAMONAL; SEYMOUR. *et al.*, 2010). O desafio bacteriano induz a produção de citocinas e
249 quimiocinas pelo epitélio gengival, resultando na expressão de moléculas de adesão, aumento
250 da permeabilidade dos capilares gengivais e quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares
251 através do epitélio juncional e no sulco gengival (FORD; GAMONAL; SEYMOUR. *et al.*,
252 2010). Se esse processo continuar, a inflamação se estende profundamente nos tecidos e causa
253 perda de tecido conjuntivo de suporte, osso alveolar e também permite a formação de uma bolsa
254 periodontal. Esses eventos patológicos recentemente descritos constituem e caracterizam o que
255 conhecemos como periodontite (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

256 O principal objetivo da terapia periodontal é regenerar o periodonto destruído por
257 doenças periodontais (QIU *et al.*, 2020). Sendo assim, a perda de dentes resulta principalmente
258 de doenças periodontais em adultos, o que adiciona um ônus substancial à saúde pública em
259 todo o mundo (TONETTI *et al.*, 2017).

260

261 **2.2.1 Gengivite e periodontite**

262 A gengivite é definida como uma inflamação da gengiva mantendo intacta a inserção de
263 tecido conjuntivo ao dente, estando, portanto, sempre limitada ao compartimento de tecido mole
264 do epitélio gengival e do tecido conjuntivo (CEKICI *et al.*, 2014).

265 Já a periodontite é uma doença crônica não transmissível, sendo que a periodontite
266 severa afeta 11,2% da população mundial, além de ser a sexta doença humana mais comum
267 (SANZ *et al.*, 2018). Uma pesquisa epidemiológica sugeriu que mais de 50% de todos os
268 adultos no mundo são afetados por doenças periodontais. Além disso, a ocorrência da doença
269 periodontal está aumentando com o tempo; no período de dez anos, de 2005 a 2015, as taxas de
270 prevalência aumentaram rapidamente em comparação com períodos anteriores (CARASOL *et*
271 *al.*, 2016).

272 O estímulo inicial para a periodontite crônica é o biofilme subgengival anexado ao dente
273 que causa a ativação da resposta imune do hospedeiro (CAVALLA *et al.*, 2018). Caracterizada
274 por danos irreversíveis nos tecidos de sustentação dos dentes, que incluem o osso alveolar,
275 ligamento periodontal e cimento. Isso eventualmente leva à perda dentária com sérios
276 problemas funcionais e estéticos para os pacientes (HERNÁNDEZ-MONJARAZ *et al.*, 2018).

277 A periodontite é uma doença complexa, com fatores etiológicos atuando em vários
278 níveis: no nível microbiano, baseado na presença de comunidades microbianas disbióticas; no
279 nível do hospedeiro, com base nas variações da resposta do hospedeiro e nos fatores genéticos
280 que podem predispor ou proteger da doença; e no nível ambiental, fatores que modificam a
281 resposta do hospedeiro em um resultado protetor ou destrutivo (HAJISHENGALLIS, 2015;
282 NIBALI, 2018). Por um processo longo e lento, a inflamação descontrolada na gengiva pode
283 levar à destruição do tecido periodontal e sua fixação nos dentes, definida como periodontite
284 (HAJISHENGALLIS e KOROSTOFF, 2017). A perda contínua de dentição para apoiar o
285 tecido resulta em folga dentária e perda de dentes, o que afeta seriamente a qualidade de vida
286 dos pacientes (EKE *et al.*, 2015).

287 A periodontite grave está independentemente e significativamente associada à
288 mortalidade relacionada a causas cardiovasculares em diferentes populações (SHARMA *et*
289 *al.*, 2014). Pacientes com periodontite apresentaram mais que o dobro do risco de AVC
290 cardioembólico e trombótico em comparação com indivíduos periodicamente saudáveis (SEN
291 *et al.*, 2018).

292 De acordo com a Nova Classificação do Workshop Mundial (2017) a periodontite é
293 avaliada de acordo com o estadiamento que envolve quatro categorias (estágios 1 a 4) e é
294 determinado após considerar muitas variáveis, incluindo perda de volume, quantidade e
295 porcentagem de perda óssea, profundidade de sondagem, pressão e extensão de defeitos ósseos
296 angulares, envolvimento de furca, mobilidade dentária e perda dentária devido à periodontite.
297 A classificação inclui três níveis (grau A - baixo risco, grau B - risco moderado, grau C – alto
298 risco de progressão) e engloba, além de aspectos relacionados à progressão da periodontite,
299 estado geral de saúde e outras exposições como tabagismo ou nível de controle metabólico no
300 diabetes. Assim, o grau permite ao clínico incorporar fatores individuais o diagnóstico de cada
301 paciente, que são cruciais para o gerenciamento abrangente dos casos (CATON *et al.*, 2018).

302

303 **2.2.2 Biofilme e espécies microbianas**

304

305 Um estudo anterior verificou inúmeras espécies microbianas que formam biofilme
306 dental organizados em uma matriz polissacarídica extracelular (ZHOU *et al.*, 2015). Os
307 biofilmes também podem se desenvolver em superfícies abióticas, incluindo dispositivos
308 médicos, como próteses ortopédicas, válvulas cardíacas artificiais, stents coronários, cateteres
309 intravasculares e urinários, implantes neurocirúrgicos, cocleares e mamários, dentaduras e
310 dispositivos oculares e de assistência ventricular (PERCIVAL *et al.*, 2015), como implantes
311 dentários.

312 Doenças periodontais são inflamações mediadas pelo crescimento excessivo de
313 organismos comensais ao invés de ser através da aquisição de um único patógeno exógeno
314 (CEKICI *et al.*, 2014). Enquanto alguns microorganismos chave parecem desencadear a
315 disbiose, a doença resulta não de patógenos individuais, mas de sinergia polimicrobiana
316 disbiótica, que interrompe a homeostase do micróbio hospedeiro (HAJISHENGALLIS;
317 LAMONT, 2016).

318 Existem evidências de que as proteínas extracelulares de patógenos periodontais
319 (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e
320 *Fusobacterium nucleatum*) geram anticorpos que podem reagir de maneira cruzada com as
321 proteínas extracelulares. Já foi demonstrado que esses anticorpos ativam a produção de
322 citocinas, bem como a ativação de monócitos e células endoteliais (SANZ *et al.*, 2018).

323 Embora a periodontite seja considerada uma doença infecciosa, a extensão e a natureza
324 da resposta inflamatória / imune do hospedeiro contra o biofilme subgengival são os principais
325 determinantes do resultado da doença (CAVALLA *et al.*, 2014). O biofilme microbiano sugere
326 que fatores microbianos poderiam, em teoria, apresentar algum impacto evolutivo na
327 resistência/suscetibilidade à periodontite. Portanto, é possível levantar a hipótese de que
328 variações genéticas que facilitam a colonização do biofilme subgengival por micróbios-chave
329 e/ou facilitam o estabelecimento de comunidades subgengivais disbióticas poderiam atuar
330 como fatores de risco primários para o desenvolvimento da periodontite, uma vez que esse
331 evento inicial levaria subsequentemente ao desequilíbrio homeostase do micróbio hospedeiro e
332 posteriormente à ruptura do tecido (HAJISHENGALLIS, 2014; HAJISHENGALLIS, 2015).

333 A periodontite é uma doença associada à resposta imune do hospedeiro causada por
334 bactérias Gram-negativas e que afeta grande parte da população mundial (GOKYU *et al.*,
335 2014). As interações entre a bactéria e o hospedeiro desencadeiam mecanismos imunológicos
336 que causam danos ao tecido periodontal (PARK *et al.*, 2015). Também há evidências baseadas
337 em estudos microbiológicos, imunológicos e clínicos que sustentam que um tipo de periodontite
338 pode permanecer estável por vários anos, enquanto as outras formas, apesar do tratamento
339 extenso, continuam a progredir, levando à perda do dente. Apesar das bactérias periodontais
340 serem os principais agentes etiológicos, a susceptibilidade do hospedeiro também é de grande
341 relevância para o desenvolvimento da periodontite (LATHA *et al.*, 2015).

342

343 **2.2.3 Patogênese**

344

345 A patogênese de doenças periodontais é mediada pela resposta inflamatória a bactérias
346 no biofilme (CEKICI *et al.*, 2014). O início e a progressão da periodontite estão relacionados a
347 múltiplos fatores etiológicos e de risco, sendo os mais importantes a microbiota local e a
348 resposta imune do hospedeiro (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2014).

349 Tal como acontece com outros locais de barreira, como o trato gastrointestinal e
350 respiratório, o tecido periodontal é continuamente exposto à microbiota oral e outros estímulos
351 físicos e químicos gerados pela mastigação e respiração (MOUTSOPOULOS; KONKEL,
352 2018). Existe um equilíbrio delicado entre a resposta imune local e a microbiota em condições
353 fisiológicas. A vigilância imunológica e a tolerância da microbiota local são alcançadas sem
354 uma resposta inflamatória grave (GRAVES *et al.*, 2019). No entanto, após a colonização de um
355 patógeno "chave", os constituintes da microbiota e suas contagens totais são alterados, o que
356 eleva a patogenicidade de toda a comunidade e interrompe a homeostase do
357 tecido (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2012). Nessas condições, a resposta imune é superativada,
358 o que leva à infiltração de células imunes, ativação da atividade osteoclástica e, eventualmente,
359 destruição dos tecidos moles e duros (PAN *et al.*, 2019).

360 A periodontite é uma doença complexa, desencadeada pela presença de comunidades
361 microbianas disbióticas, modulada por fatores genéticos e modificada pela resposta imune do
362 hospedeiro, que pode ser protetora ou destrutiva (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2015).

363 A patogênese das doenças periodontais é influenciada por vários fatores do hospedeiro,
364 incluindo resposta imune, fatores anatômicos e fatores estruturais do tecido. A maioria desses
365 fatores é determinada por perfil genético do hospedeiro e pode ser modificado por meio de
366 fatores comportamentais do hospedeiro. Doenças periodontais e certos distúrbios sistêmicos
367 compartilham etiologias genéticas e/ou ambientais similares fatores biológicos e, portanto,
368 indivíduos afetados podem mostrar declarações de ambas as doenças. Portanto, a perda de
369 tecido periodontal é uma manifestação comum de certos distúrbios sistêmicos, que poderiam
370 têm importante valor diagnóstico e implicações terapêuticas (ALBANDAR *et al.*, 2018).

371 Outras condições sistêmicas, como doenças neoplásicas, podem afetar a aparelho
372 periodontal independente da placa dentária induzida por biofilme periodontite (JEPSEN *et al.*,
373 2018), e esses achados clínicos também devem ser classificados com base na doença sistêmica
374 primária e agrupados como doenças ou condições que afetam os tecidos periodontais de
375 suporte. Existem, porém, doenças sistêmicas comuns, como doenças não controladas diabetes
376 mellitus, com efeitos variáveis que modificam o curso da periodontite. Estes parecem fazer
377 parte da natureza multifatorial das doenças complexas como periodontite e estão incluídas na
378 nova classificação clínica da periodontite como descritor no estadiamento e processo de
379 classificação (TONETTI *et al.*, 2017). Embora modificadores comuns da periodontite possam

380 alterar substancialmente a ocorrência, gravidade e resposta da doença ao tratamento evidência
381 atual não suporta uma fisiopatologia única em pacientes com diabetes e periodontite (SANZ *et*
382 *al.*, 2018).

383

384 **2.2.4 Diagnóstico clínico e tratamento da doença periodontal**

385

386 O diagnóstico clínico da doença periodontal é realizado com uma sonda periodontal
387 para determinar a profundidade de bolsa e da perda de inserção em combinação com avaliação
388 radiográfica (CEKICI *et al.*, 2014).

389 A perda do suporte do tecido periodontal devido a inflamação é a principal característica
390 da periodontite. Um limiar de perda de inserção clínica interproximal de ≥ 2 mm ou ≥ 3 mm em
391 ≥ 2 dentes não adjacentes é comumente usado. Os dentistas geralmente confirmam a presença
392 de perda interproximal de tecido através de avaliações radiográficas da perda óssea. As
393 descrições clinicamente significativas da periodontite devem incluir a proporção de locais que
394 sangram durante a sondagem e o número e a proporção de dentes com profundidade de
395 sondagem acima de certos limiares (geralmente ≥ 4 mm e ≥ 6 mm) e de dentes com perda de
396 inserção clínica de ≥ 3 mm e ≥ 5 mm (HOLTFRETER *et al.*, 2015).

397 No contexto de atendimento clínico, um paciente é um "caso de periodontite" se: a perda
398 de inserção clínica interdental é detectável em ≥ 2 dentes não adjacentes ou a perda de inserção
399 clínica bucal ou oral ≥ 3 mm com bolsas ≥ 3 mm é detectável em ≥ 2 dentes, mas a perda de
400 inserção clínica observada não pode ser atribuída a causas não relacionadas à periodontite,
401 como: 1) recessão gengival de origem traumática; 2) cárie dentária que se estende na área
402 cervical do dente; 3) presença de CAL no aspecto distal de um segundo molar e associada à má
403 posição ou extração de um terceiro molar; 4) lesão endodôntica drenando através do periodonto
404 marginal; e 5) a ocorrência de uma fratura vertical da raiz (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

405 Um estudo anterior relata que o acompanhamento da imagem radiográfica é essencial
406 para a manutenção bem-sucedida dos implantes endósseos e para a minimização das alterações
407 no nível ósseo circundante (PAN *et al.*, 2019).

408 Por outro lado, outro estudo demonstra que critérios diagnósticos clínicos
409 convencionais, como profundidade de sondagem, nível de inserção, sangramento à sondagem,
410 índice de placa e avaliação radiográfica para verificar perda do osso alveolar, muitas vezes é

411 insuficiente para determinar os locais da atividade doença, monitorar as respostas à terapia ou
412 medir o grau de suscetibilidade à futura progressão da doença (GUPTA *et al.*, 2015).

413 Em relação ao tratamento periodontal não é tão fácil quanto apenas controlar a
414 inflamação e impedir o desenvolvimento da doença; a reconstrução de um periodonto saudável
415 destruído por doenças merece igual atenção (GRAZIANI; KARAPETSA; ALONSO;
416 HERRERA, 2017; GRAZIANI; KARAPETSA; MARDAS; LEOW; DONOS, 2018). As
417 terapias atuais para doenças periodontais na clínica, incluindo abordagens conservadoras,
418 condicionamento radicular, enxerto/substituição bioativa de ossos e regeneração guiada de
419 tecidos, encontram dificuldade em regenerar completamente o periodonto (VAQUETTE *et al.*,
420 2019).

421 O objetivo do tratamento periodontal é controlar a infecção e reconstruir as estruturas e
422 funções dos tecidos periodontais (SCULEAN *et al.*, 2015). Ainda existem desafios na
423 regeneração do aparelho periodontal com a formação do complexo osso-ligamento-cimento
424 simultaneamente (SOWMYA *et al.*, 2017). O processo osteogênico pode preceder levemente a
425 diferenciação do cimento e das fibras. Então o ligamento periodontal precisaria ser firmemente
426 fixado ao cimento recém-formado e ao osso alveolar, o que é especialmente difícil de alcançar
427 em laboratório (MASKE; RATHOD; WANIKAR *et al.*, 2018).

428 Um recente ensaio clínico randomizado concluiu que a terapia periodontal (por meio de
429 raspagem e aplainamento radicular, SRP) induzia bacteremia em pacientes com gengivite e
430 periodontite, mas a magnitude e a frequência eram maiores entre os pacientes com periodontite
431 (BALEJO *et al.*, 2017).

432 Os dentistas devem ser capazes de identificar os sinais precoces da doença gengival,
433 mas os pacientes também devem suspeitar de doença gengival se perceberem: Gengivas
434 vermelhas ou edemaciadas; sangramento das gengivas ou sangue após a escovação; mau gosto;
435 dentes com aparência mais longa; dentes com mobilidade; espaços crescentes entre dentes;
436 cálculo (tártaro) nos dentes. Os pacientes devem entender que é importante manter a boca e o
437 corpo todo o mais saudáveis possíveis, com visitas médicas e odontológicas regulares (SANZ
438 *et al.*, 2018).

439

440

441

2.3 DOENÇAS PERI-IMPLANTARES: MUCOSITE E PERI-IMPLANTITE

Uma nova classificação para saúde peri-implantar, mucosite e peri-implantite foram desenvolvidas pelo Workshop Mundial (2017) sobre a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares.

2.3.1 Saúde peri-implantar

O diagnóstico de saúde peri-implantar requer ausência de sinais clínicos de inflamação; ausência de sangramento e/ou supuração na sondagem suave; nenhum aumento na profundidade de sondagem em comparação com exames anteriores; ausência de perda óssea além das mudanças no nível da crista óssea resultantes desde a remodelação óssea inicial (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

A saúde peri-implantar foi definida clinicamente e histologicamente (ARAUJO *et al.*, 2018). Clinicamente, a saúde peri-implantar é caracterizada pela ausência de sinais de inflamação e sangramento na sondagem. Saúde peri-implantar pode existir ao redor de implantes com suporte ósseo normal ou reduzido. Isto não é possível definir uma gama de profundidades de sondagem compatíveis com saúde peri-implantar (BERGLUNDH *et al.*, 2018; RENVERT *et al.*, 2018). Na saúde, não existem diferenças visuais entre os tecidos peri-implantares e periodontais. No entanto, as profundidades de sondagem são geralmente maiores no local do implante do que no dente. As papilas nos locais interproximais de um implante podem ser mais curtas do que nas papilas dentais interproximais (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

As características histológicas de um local peri-implantar saudável são derivadas principalmente de estudos em animais. A mucosa peri-implantar saudável tem em média 3 a 4 mm de altura e é coberta por um epitélio queratinizado (mucosa mastigatória) ou não queratinizado (mucosa de revestimento). A porção da mucosa peri - implantar que está voltada para o implante contém uma porção "coronal" que é revestida por um epitélio sulcular e um epitélio juncional delgado, e um segmento mais "apical" no qual o tecido conectivo está em contato direto com a superfície do implante. O tecido conjuntivo lateral ao epitélio sulcular abriga um pequeno infiltrado de células inflamatórias. A maior parte da parte intra-óssea do

472 implante está em contato com o osso mineralizado, enquanto a porção restante fica voltada para
473 a medula óssea, estruturas vasculares ou tecido fibroso (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

474

475 **2.3.2 Mucosite**

476

477 A mucosite peri-implantar é caracterizada por sangramento na sondagem e sinais visuais
478 de inflamação (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018). Embora haja fortes evidências de que a
479 mucosite peri-implantar é causada por placa, há evidências muito limitadas da presença de
480 mucosite peri-implantar induzida por placa. A peri-implantite à mucosite pode ser revertida
481 com medidas em eliminar a placa (CATON *et al.*, 2018).

482 A mucosite peri-implantar também é caracterizada por uma maturação inflamatória bem
483 definida lateral ao epitélio juncional / bolsa com um infiltrado rico em estruturas vasculares,
484 células plasmáticas e linfócitos. O infiltrado inflamatório não se estende ao epitélio juncional
485 para a zona de tecido conjuntivo (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

486 Existem fortes evidências de estudos experimentais em animais e humanos de que a
487 placa é o fator etiológico da mucosite peri-implantar. O hospedeiro responder ao desafio
488 bacteriano pode variar entre os pacientes. Fumar, diabetes mellitus e radioterapia podem
489 modificar a condição (BERGLUNDH *et al.*, 2018). Presume-se que a mucosite peri-implantar
490 preceda a peri-implantite especialmente na ausência de cuidados de manutenção regular. No
491 entanto, os recursos ou condições caracterizando a progressão da mucosite peri-implantar para
492 peri-implantite em pacientes suscetíveis não foi identificada (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

493 A principal característica clínica da mucosite peri-implantar é o suave sangramento à
494 sondagem. Os sinais clínicos de inflamação são necessários para o diagnóstico de mucosite
495 peri-implantar. Eritema, edema e/ou supuração também podem estar presentes (BERGLUNDH
496 *et al.*, 2018).

497 Há evidências de estudos experimentais em humanos que na mucosite peri-implantar há
498 resolução dos sinais clínicos de inflamação que pode levar mais de 3 semanas após a
499 reinstituição do controle de placa / biofilme (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

500

501

502

503 **2.3.3 Peri-implantite**

504

505 A peri-implantite, umas das principais causas de insucesso dos implantes (DE
506 OLIVEIRA et al., 2015), é uma inflamação em torno do implante instalado, sendo considerada
507 um desequilíbrio do hospedeiro-microrganismo, onde é mais propício a lesões inflamatórias,
508 pelo fato de que os tecidos fibrosos de inserção nos implantes são diferentes do dente em si,
509 pois tem menos vascularização e a direção das fibras colágenas tem direção paralela. Essa
510 doença causa perda de suporte ósseo podendo acarretar a perda do implante (DIÓGENES *et*
511 *al.*, 2018).

512 A peri-implantite é definida como uma condição patológica associada à placa que ocorre
513 no tecido ao redor dos implantes dentários, caracterizada por inflamação na mucosa peri-
514 implantar e subsequente perda progressiva do osso de suporte (SCHWARZ *et al.*, 2018). A
515 peri-implantite está associada ao mau controle da placa e à pacientes com histórico de
516 periodontite grave. O início da peri-implantite pode ocorrer precocemente após a colocação do
517 implante, conforme indicado pelos dados radiográficos. Na ausência de tratamento, parece
518 progredir em um padrão não linear e acelerador (SCHWARZ *et al.*, 2018).

519

520 **2.3.4 Patogênese, diagnóstico e tratamento da peri-implantite**

521

522 Há fortes evidências de que existe um risco aumentado de desenvolver peri-implantite
523 em pacientes com histórico de periodontite grave, controle deficiente da placa e nenhum
524 cuidado de manutenção regular após a terapia com implantes. Os dados que identificam o fumo
525 e o diabetes como indicadores de risco potencial para peri-implantite são inconclusivos. Os
526 implantes que foram colocados em circunstâncias abaixo do ideal são frequentemente
527 encontrados na prática do dia-a-dia. Como resultado, pode haver um aumento da prevalência
528 de peri-implantite associada a essas situações. Existem algumas evidências limitadas que ligam
529 a peri-implantite a fatores como a presença pós - restauradora de cimento submucoso e o
530 posicionamento dos implantes que não facilita a higiene oral e a manutenção. O papel da
531 mucosa queratinizada peri-implantar, sobrecarga oclusal, partículas de titânio, necrose por
532 compressão óssea, superaquecimento, micromoção e biocorrosão como indicadores de risco
533 para peri-implantite ainda precisa ser determinado. Há uma alta prioridade para conduzir

534 estudos que visam desenvolver estratégias diagnósticas, preventivas e de intervenção para o
535 gerenciamento dessas questões peri-implantar (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

536 A perda óssea progressiva em torno dos implantes está associada a sinais clínicos da
537 inflamação. Estudos observacionais indicaram que as alterações no nível da crista óssea em
538 implantes estão normalmente associadas a sinais clínicos de inflamação. No entanto, existem
539 situações em que pode ocorrer perda óssea peri-implantar devido a fatores iatrogênicos,
540 incluindo mau posicionamento do implante ou trauma cirúrgico (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

541 Os métodos clínicos para detectar a presença ou ausência de inflamação no local do
542 implante deve incluir inspeção visual, sondagem com uma sonda periodontal e palpação digital
543 (BERGLUNDH *et al.*, 2018). Estudos experimentais e clínicos têm identificado vários critérios
544 de diagnóstico para a peri-implantite, incluindo parâmetros de sondagem, avaliação
545 radiográfica, avaliação do fluido crevicular peri-implantar e análise de saliva (SEVERINO *et*
546 *al.*, 2016; DE ARAÚJO *et al.*, 2017).

547 O diagnóstico de peri-implantite requer presença de sangramento e / ou supuração na
548 sondagem; maior profundidade de sondagem em comparação com exames anteriores; presença
549 de perda óssea, além das alterações no nível da crista óssea resultantes desde a remodelação
550 óssea inicial. Na ausência de dados de exames anteriores, o diagnóstico de peri-implantite pode
551 ser baseado na combinação de: presença de sangramento e / ou supuração em sondagem suave.
552 profundidades de sondagem de ≥ 6 mm. Níveis ósseos ≥ 3 mm apicais da porção mais coronal
553 da parte intraóssea do implante. Deve-se observar que os sinais visuais de inflamação podem
554 variar e que a recessão da margem da mucosa deve ser considerada na avaliação da
555 profundidade de sondagem (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

556 É necessário sondar os tecidos peri-implantares em um exame oral completo para avaliar
557 a presença de sangramento na sondagem e monitorar as mudanças na profundidade da
558 sondagem e a migração da margem mucosa. Essa avaliação pode alertar o clínico sobre a
559 necessidade de intervenção terapêutica. Há evidências de que a sondagem do tecido peri-
560 implantar usando uma leve força de sondagem é um componente seguro e importante de um
561 exame oral completo (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

562 Os sinais e sintomas principais da peri-implantite são: presença de bolsa peri-implantar
563 (> 5 mm), sangramento à sondagem, destruição vertical da crista óssea. A presença de
564 hiperplasia pode estar relacionada à utilização de overdentures ou ausência de gengiva

565 queratinizada. Em relação aos tecidos podem estar edemaciados ou não e a dor não é
566 considerada ponto característico da peri-implantite. Para um correto diagnóstico, segundo os
567 autores, devem ser realizados: uma radiografia peri-implantar (se o implante já apresenta perda
568 óssea ou não), sondagem peri-implantar (analisar a presença de bolsas, de sangramento e de
569 supuração), mobilidade, uma coleta de fluido e análise microbiológica (DE OLIVEIRA *et al.*,
570 2015).

571 Os locais de peri-implantite exibem sinais clínicos de inflamação, sangramento na
572 sondagem e / ou supuração, aumento da profundidade de sondagem e / ou recessão da margem
573 mucosa, além de perda óssea radiográfica em comparação com exames anteriores. Em locais
574 que apresentam peri-implantite, a profundidade de sondagem está correlacionada com a perda
575 óssea e é, portanto, um indicador da gravidade da doença. É importante reconhecer que a taxa
576 de progressão da perda óssea pode variar entre os pacientes (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

577 Sendo assim, para o diagnóstico de peri-implantite são consideradas as alterações no
578 nível da crista óssea em conjunto com sangramento à sondagem e concomitante
579 aprofundamento da bolsa peri-implantar (WANG *et al.*, 2016). Embora as alterações iniciais na
580 saúde dos tecidos moles peri-implantes sejam difíceis de diagnosticar, está bem estabelecido
581 que o sangramento na sondagem é o método preferido para identificar a inflamação da mucosa
582 peri-implantar (JEPSEN *et al.*, 2015).

583 O diagnóstico da peri-implantite é muito importante na prática do cirurgião-dentista, e
584 determinante para o tratamento dessas doenças, criando novas vertentes de estudos na
585 especialidade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Algumas características clínicas podem ser
586 observadas nesse processo inflamatório, tais como: sangramento à sondagem, exsudato,
587 profundidade de sondagem aumentada e edema (MARTINS *et al.*, 2019).

588 A cicatrização normal após a perda dentária leva a dimensões diminuídas do processo /
589 crista alveolar que resultam em defeitos nos tecidos duros e moles. Deficiências maiores de
590 crista podem ocorrer em locais associados a perda severa de suporte periodontal, trauma de
591 extração, infecções endodônticas, fraturas radiculares, placas ósseas bucais finas, má posição
592 do dente, lesão e pneumatização dos seios maxilares. Outros fatores que afetam a crista podem
593 estar associados a medicamentos e distúrbios sistêmicos, reduzindo a quantidade de osso

594 formado naturalmente, a agenesia dentária e a pressão das próteses (HÄMMERLE; TARNOW
595 *et al.*, 2018).

596 O objetivo do tratamento da peri-implantite é reduzir a perda óssea e consiste em duas
597 etapas: a primeira é a terapia mecânica básica, ou seja, remoção da placa com curetas de
598 plástico, seguida de ajuste oclusal. A segunda etapa requer a descontaminação da superfície do
599 implante que pode ser física em que consiste no alisamento da superfície do implante com
600 brocas diamantadas, como também no jateamento com óxido de alumínio. E química em que o
601 jato de bicarbonato e o ácido cítrico apresentaram os melhores resultados. O uso de
602 antibioticoterapia apresenta bons resultados na erradicação da infecção (DE OLIVEIRA *et al.*,
603 2015).

604 Há evidências de estudos observacionais de que os pacientes que apresentam controle
605 deficiente da placa e não frequentam a terapia de manutenção regular têm maior risco de
606 desenvolver peri-implantite. Estudos sobre o tratamento da peri-implantite revelam que as
607 estratégias de tratamento anti-infecciosas têm sucesso na redução da inflamação dos tecidos
608 moles e na supressão da progressão da doença (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

609

610 **2.4 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇA PERI-** 611 **IMPLANTAR**

612

613 Embora a peri-implantite e a periodontite tenham muitas características em comum nos
614 sinais clínicos e radiológicos, elas representam entidades distintas (ROBITAILLE *et al.*, 2015)
615 por causa de seus diferentes ambientes anatômicos e histológicos, microbiomas centrais
616 (MARUYAMA *et al.*, 2014) e características imunológicas (EMECEN-HUJA *et al.*, 2013). A
617 peri-implantite apresenta características únicas (LANG; BERGLUNDH *et al.*, 2011) e a
618 destruição dos tecidos peri-implantares parece significativamente maior do que a da
619 periodontite (TAKAMORI *et al.*, 2017). A peri-implantite é considerada como resultado da
620 formação de biofilme na superfície do implante análogo à periodontite (JOHN; BECKER;
621 SCHWARZ *et al.*, 2015).

622 Há fortes evidências de que existe um risco aumentado de desenvolver peri-implantite
623 em pacientes com histórico de periodontite grave, controle deficiente da placa e nenhum
624 cuidado de manutenção regular após a terapia com implantes (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

625 Pacientes com periodontite apresentam cerca de quatro vezes mais chances de desenvolver peri-
626 implantite (ZANI *et al.*, 2016).

627 As principais diferenças histológicas entre os tecidos peri-implantares saudáveis e os
628 tecidos periodontais são as seguintes: em comparação com o periodonto, os tecidos peri-
629 implantares não possuem cemento e ligamento periodontal. O epitélio peri-implantar é
630 frequentemente mais longo e na zona do tecido conjuntivo não há fibras de inserção na
631 superfície do implante. Os tecidos peri-implantares são menos vascularizados na zona entre a
632 crista óssea e o epitélio juncional quando comparados à zona de tecido conjuntivo do periodonto
633 (BERGLUNDH *et al.*, 2018).

634

635 **2.5 CITOCINAS NAS DOENÇAS PERIODONTAIS E PERI-IMPLANTARES**

636

637 **2.5.1 Citocinas nas doenças periodontais**

638

639 Na progressão da periodontite, o papel das citocinas é extremamente importante. Muitos
640 estudos relataram a rede de citocinas envolvidas na periodontite e seu efeito crucial e
641 pleiotrópico no recrutamento de leucócitos, controle de bactérias potencialmente patogênicas e
642 indução ou supressão da atividade osteoclástica (PAN *et al.*, 2019).

643 Muitos estudos recentes descobriram que polimorfismos de nucleotídeo único em
644 citocinas e genes codificadores de receptores associados estão relacionados ao risco e à
645 gravidade da periodontite (BOUKORTT *et al.*, 2015; TANAKA *et al.*, 2017), o que indica que
646 a regulação desordenada das citocinas inicia ou acelera a periodontite. Com base em estudos
647 em humanos, estudos em modelos experimentais de periodontite em animais também
648 descobriram que manipular a expressão de citocinas e seus receptores afeta o fenótipo de perda
649 óssea alveolar (ESKAN *et al.*, 2012).

650 A resposta imune patológica do hospedeiro contra micróbios disbióticos locais pode ser
651 categorizada aproximadamente em três estágios (PAN *et al.*, 2019). A primeira onda de desafio
652 ocorre diretamente entre o microbioma e as células hospedeiras que incluem células do tecido
653 periodontal, a saber, células epiteliais da mucosa e fibroblastos gengivais e outros
654 imunócitos. Além disso, devido à estimulação contínua e aos danos causados pelo microbioma
655 e mastigação locais, células imunes como fagócitos mononucleares (MNPs), células

656 apresentadoras de antígenos (APCs) e subconjuntos específicos de células T (como células T
657 auxiliares do tipo 17, Th17 células) residem localmente e podem ser recrutados. As interações
658 entre o microbioma e todas as células hospedeiras levam à primeira onda de secreção de
659 citocinas pela ativação do receptor de reconhecimento de padrões e sua sinalização a jusante. Os
660 representantes dessas citocinas são a família interleucina-1 (IL-1), a família Interleucina 6 (IL-
661 6) e o fator de necrose tumoral (TNF). Essas citocinas têm efeitos pleiotrópicos na promoção
662 de linfócitos e destruição de tecidos e são reconhecidas como citocinas pró-inflamatórias (PAN
663 *et al.*, 2019).

664 O segundo estágio ocorre quando um grupo de citocinas estreitamente relacionadas à
665 diferenciação de um subconjunto específico de linfócitos é secretado por MNPs, APCs e
666 linfócitos locais após estimulação pelo microbioma. Com a participação de membros das
667 famílias IL-1 e IL-6, a estimulação dessas citocinas leva à ativação das vias de sinalização
668 correspondentes e à maturação e diferenciação de certas células (PAN *et al.*, 2019).

669 A terceira onda ocorre quando cada um desses subconjuntos de células secretam um
670 certo padrão de citocinas, que podem atuar como um mecanismo de feedback positivo ou efector
671 direto. A maioria dos efeitos dessas citocinas e subconjuntos celulares é extremamente
672 complexo, incluindo aumento da barreira mucosa, controle de patobiontes (PAN *et al.*, 2019).

673 As citocinas pró-inflamatórias incluem membros da família IL-1, família IL-6 e família
674 TNF. A maioria dos membros da família IL-1 (representada por IL-1, IL-18 e IL-33), IL-6 e
675 TNF tem efeitos pleiotrópicos na promoção de linfócitos e destruição de tecidos e atuam como
676 citocinas pró-inflamatórias. Ao se ligarem ao receptor correspondente, os membros da família
677 IL-1 ativam principalmente fatores de transcrição relacionados à ativação de células T e
678 secreção pró-inflamatória de citocinas, e IL-6 medeia principalmente a ativação de células B.
679 Dependendo do estado das principais proteínas de transdução, a ligação entre os membros da
680 família TNF e seus receptores relacionados pode levar a destinos celulares muito diferentes que
681 incluem morte (apoptose e necroptose) ou vida (secreção de fatores pró-inflamatórios e
682 osteoclastogênicos) e ambos levam à destruição do tecido periodontal (PAN *et al.*, 2019).

683 Existem evidências de níveis elevados de interleucina sérica 6 (IL-6) em pacientes com
684 periodontite e níveis mais baixos de Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 18 (IL-18). O efeito da
685 terapia periodontal demonstrou uma diminuição significativa nos níveis séricos de Interleucina
686 6 (IL-6), amilóide sérico A e alfa 1 anti-quimiotripsina. Os neutrófilos periféricos dos pacientes

687 com periodontite liberam excesso de IL-1 β , IL-8, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α
688 quando estimulados por patógenos periodontais. A terapia periodontal reduz apenas
689 parcialmente a hiper-reatividade das citocinas com algumas evidências de uma resposta
690 constitutivamente elevada (LING *et al.*, 2016).

691 A IL-18 foi reconhecida pela primeira vez como fator indutor de interferon (IFN) - γ e
692 ativador de células NK (natural killer) e células Th1, que estão intimamente relacionadas à
693 imunidade do tipo 1 (OKAMURA *et al.*, 1995). Polimorfismos foram identificados no
694 promotor da IL-18 e também mostraram estar relacionados ao aumento do risco de periodontite
695 (TANAKA *et al.*, 2017). Além disso, a regulação positiva da IL-18 foi detectada no FCG
696 (FIGUEREDO *et al.*, 2008), saliva (ÖZÇAKA *et al.*, 2011), e soro (SÁNCHEZ-
697 HERNÁNDEZ *et al.*, 2011) de pacientes com periodontite crônica. *P. gingivalis* ativo e seu
698 lipopolissacarídeo (LPS) mostraram aumentar a expressão de IL-18 (YEE *et al.*, 2012). Além
699 disso, a IL-18 mostrou estimular a expressão da metaloproteinase da matriz, (WANG *et al.*,
700 2019) e a superexpressão de IL-18 leva à perda óssea inflamatória após infecção bacteriana oral
701 YOSHINAKA *et al.*, 2014).

702 RANKL existe como uma proteína homotrimérica e é tipicamente ligada à membrana
703 em células T osteoblásticas e ativadas ou é secretada por algumas células, como células T
704 ativadas (KEARNS *et al.*, 2007; WADA *et al.*, 2006; TAKAYANAGI *et al.*, 2007). A citocina
705 RANK está relacionada com a osteoclastogênese e reabsorção óssea. Alguns estudos
706 demonstraram que a inibição de RANKL diminui a reabsorção óssea periodontal (HAN, 2015).
707 A maioria dos fatores conhecidos por estimular a formação e atividade de osteoclastos induz a
708 expressão de RANKL pelas células estromais osteoblásticas. No entanto, RANKL também é
709 altamente expresso em linfonodos, timo, glândulas mamárias e pulmão e em níveis baixos em
710 uma variedade de outros tecidos, incluindo baço e medula óssea (KEARNS *et al.*, 2007). É
711 expresso por células sinoviais e células T ativadas em articulações de pacientes com artrite
712 inflamatória para contribuir, pelo menos em parte, para a destruição articular observada em
713 pacientes com artrite reumatóide (BOYCE *et al.*, 2008).

714 As citocinas estão intimamente associadas a certos subconjuntos de células, incluindo
715 células Th1, células Th2, células Th17 e células Treg (T reguladoras) relacionadas às
716 citocinas. Essas citocinas e suas células relacionadas formam uma rede de resposta imune do
717 hospedeiro complexa e integrada contra bactérias. A maioria das citocinas restantes está

718 intimamente relacionada à diferenciação e / ou efeitos de subconjuntos específicos de células
719 imunes. Sob estímulo de certas citocinas inflamatórias, as células T CD4 + ingênuas
720 diferenciam-se em múltiplas direções, incluindo as células Th1 (Interleucina 12 - IL-12) e Treg
721 - Interleucina 2 (IL-2) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que têm
722 principalmente efeitos protetores, e Th17 (Interleucina 23 - IL-23) e células Th2 (Interleucina
723 4 - IL-4), que têm principalmente efeitos pleiotrópicos. As vias de sinalização a jusante da
724 Interleucina 17 (IL-17) (secretada pelas células Th17) e da Interleucina 10 (IL-10) (secretada
725 pelas células Treg) são específicas e de significado especial para a resposta imune do
726 hospedeiro periodontal (PAN *et al.*, 2019).

727 Dentre estas citocinas podemos citar a IL-12 que é secretada por PMNs e células
728 dendríticas sob estimulação de patógenos e exibe forte capacidade de promover a produção de
729 IFN- γ nas células T e NK (TRINCHIERI, 2003). Células T CD4 + ingênuas diferenciam-se em
730 células Th1 na presença de IL-12 com a ativação dos fatores de transcrição STAT-4 e T-bet e
731 secretam um grupo de citocinas incluindo IL-12 (como resposta positiva) (GLIMCHER, 2007)
732 e IFN- γ para depuração bacteriana (TRINCHIERI *et al.*, 2003). Embora a resposta Th1 possa
733 ocorrer durante o estabelecimento da inflamação, ela também pode atuar para proteger contra
734 a destruição do tecido (PAN *et al.*, 2019).

735 A quantidade de IL-12 no FCG dos pacientes com periodontite crônica foi semelhante
736 à dos controles saudáveis (STADLER *et al.*, 2016) e aumentou após a terapia periodontal não
737 cirúrgica (SHARMA *et al.*, 2014). Além disso, a IL-12 e o IFN- γ foram negativamente
738 correlacionados com a profundidade do sulco gengival (JOHNSON; SERIO, 2005). Além
739 disso, achados iniciais mostraram que IL-12 e IFN- γ inibem a osteoclastogênese e a reabsorção
740 óssea (HORWOOD *et al.*, 2005) *in vitro*, e a IL-12 não está envolvida na reabsorção óssea
741 induzida por infecção *in vivo* (SASAKI *et al.*, 2004). Tomados em conjunto, esses resultados
742 sugerem que as células IL-12, IFN- γ e, presumivelmente, Th1 mediam a eliminação de
743 bactérias locais e o controle de *P. gingivalis*, suprimem a atividade osteoclástica e exibem
744 principalmente efeitos protetores na patogênese da periodontite (PAN *et al.*, 2019).

745 A IL-10 é uma citocina em que evidências extensas vinculam níveis aumentados de
746 dessa citocina com resistência à perda óssea inflamatória na periodontite experimental (YU *et*
747 *al.*, 2017). Um estudo recente demonstrou que a deficiência genética de IL-10 leva a alterações
748 taxonômicas significativas no microbioma intestinal (LU *et al.*, 2014), sugerindo que um efeito

749 semelhante pode ocorrer no ambiente periodontal. Portanto, a existência de padrões diferenciais
750 de infecção subgingival em associação com genótipos distintos de IL-10 parece biologicamente
751 plausível e pode contribuir para o desenvolvimento de periodontite, permitindo o
752 estabelecimento de uma microflora subgingival disbiótica (CAVALLA *et al.*, 2018).

753 Importantes citocinas como IFN- γ e TGF- β , também, estão presentes em quande
754 quantidade no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica em relação a
755 pacientes saudáveis antes de tratamento periodontal não cirúrgico, mas após sete dias de
756 tratamento periodontal há exacerbação precoce da resposta imune em nível local representada
757 pelo aumento níveis de IFN- γ e diminuição dos níveis de TGF- β no fluido crevicular gengival
758 (ESCOBAR *et al.*, 2018).

759 Além das citocinas relacionadas às células Treg, algumas outras citocinas têm efeitos
760 anti-inflamatórios na periodontite. A Interleucina 11 (IL-11) é um membro da família
761 Interleucina 6 (IL-6) que também ativa a via de sinalização JAK/STAT3 através de sua ligação
762 ao complexo IL-11R receptor alfa (IL-11R α) e a transdução de sinal subunidade β (gp130) (IL-
763 11R α -gp130) (MURAKAMI; KAMIMURA; HIRANO, 2019).

764 A IL-27, um membro da família IL-12, é uma citocina heterodimérica que consiste em
765 duas subunidades: IL-27 p28 (também conhecida como IL-30) e molécula 3 induzida pelo vírus
766 Epstein-Barr (EBI3). Foi descoberto pela primeira vez que (DEVERGNE *et al.*, 1996). IL-27
767 promove a resposta Th1 ativando a secreção de IFN- γ em células T CD4⁺ e células NK
768 (PFLANZ *et al.*, 2002).

769 Em um estudo anterior foi relatado que a IL-37 secretada pelas células Treg suprime a
770 função das células NK (SARHAN *et al.*, 2018), indicando que a IL-37 é uma citocina anti-
771 inflamatória.

772

773 **2.5.2 Citocinas nas doenças peri-implantares**

774

775 As citocinas são os principais moduladores tanto da homeostase quanto dos processos
776 inflamatórios que atuam na primeira onda de respostas contra patógenos e estímulos em locais
777 de barreira e conectam células de tecido com linfócitos e populações de células acessórias
778 (GRAVES, 2008). O monitoramento e a detecção dos biomarcadores no fluido das fendas
779 gengivais dos pacientes com peri-implantite contribuiriam para a predição da atividade da

780 doença (PAVAN KUMAR; JAGDISHREDDY; RAJA BABU, 2015). Estes biomarcadores no
781 fluido gengival crevicular, saliva e soro também podem ajudar a avaliar os processos biológicos
782 normais e a patogênese da doença, bem como as respostas ao tratamento medicamentoso (GAO
783 *et al.*, 2018).

784 Portanto, a avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias em doenças peri-implantares,
785 podem permitir a identificação da doença ativa, o que pode ser uma ferramenta para o
786 diagnóstico precoce e tratamento (FAOT *et al.*, 2015).

787

788 **2.5.3 IL-12**

789

790 A interleucina-12 (IL-12) é uma glicoproteína heterodimérica ligada a dissulfeto que
791 consiste em uma subunidade 35 (p35) e 40 (p40) - kDa (YOON *et al.*, 2000).

792 A família IL-12 são citocinas heterodiméricas caracterizadas por três subunidades alfa
793 (p19, p28, p35) e duas subunidades beta (EBI3 e p40), que formam seis pares diferentes.
794 Existem evidências conclusivas de que o emparelhamento ocorre *in vivo* para IL-12 (p35 / p40),
795 IL-23 (p19 / p40) e IL-27 (p28 / EBI3). A semelhança de estrutura na família IL-12 leva a
796 propriedades biológicas muito diferentes (AHMED *et al.*, 2019).

797 A IL-12 pode melhorar a ativação de células *natural killer* (NK) e linfócitos T
798 citotóxicos (CTLs), promovendo a produção de interferon-gama (IFN- γ) e induzindo a
799 diferenciação de células T auxiliares (NASTALA *et al.*, 1994; AMSEN *et al.*, 2009). A IL-12
800 também possui atividades antitumorais, antiangiogênicas e antimetastáticas potentes.

801 Esta citocina desempenha um papel essencial nas interações entre a imunidade inata e
802 adaptativa, atuando nas células natural killer (NK) e nas células T, aumentando a geração e a
803 atividade de linfócitos citotóxicos (GELDHOF *et al.*, 1998; GATELY *et al.*, 1992).

804 As células Th1 secretam principalmente IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α e TNF- β , e estão
805 envolvidas principalmente na ativação de macrófagos (FERNANDES *et al.*, 2016).

806 Já foi demonstrado que a IL-12 induz resposta antitumoral em modelo murino de
807 mesotelioma maligno (CAMINSCHI *et al.*, 1998). Os ensaios clínicos em pacientes com câncer
808 revelaram atividades terapêuticas promissoras, mas também mostraram que a IL-12 humana
809 recombinante é extremamente tóxica para os seres humanos (SIDDIQUI *et al.*, 2007).

810 Podemos citar importantes mediadores da inflamação e imunidade na patogênese da
811 peri-implantite como citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-
812 12, IL-17 e RANKL), citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10) e quimiocinas
813 (por exemplo, IL-8, proteína quimioatrativa de monócitos-1, proteína inflamatória de
814 macrófagos-1a) (LI; WANG *et al.*, 2014; CANDEL-MARTÍ *et al.*, 2011; JAVED *et al.*, 2011).

815 Estudos anteriores mostram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-
816 6, IL-17, TNF- α e IL-12 no Fluido Crevicular Peri-implantar (FCP) de pacientes com peri-
817 implantite, quando comparados com implantes saudáveis (ATA-ALI *et al.*, 2015; WANG *et*
818 *al.*, 2016).

819

820 **2.5.4 IL-15**

821

822 A interleucina-15 (IL-15) é um membro da família de citocinas dos quatro feixes de α -
823 hélices que inclui IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21. A IL-15 compartilha a cadeia γ do receptor de
824 citocina comum (γ_c ; também conhecido como CD132) de seu receptor heterodimérico com os
825 receptores de IL-2, IL-7, IL-4, IL-9 e IL-21 e compartilha a cadeia β (IL-2 / IL-15R β ; também
826 conhecida como CD122) com o receptor para IL-2 (ROCHMAN *et al.*, 2009; WALDMANN,
827 2006).

828 Desde sua descoberta em 1994 (BAMFORD *et al.*, 1994; BURTON *et al.*, 1994;
829 GRABSTEIN *et al.*, 1994), o papel da IL-15 expandiu-se de um fator de crescimento de células
830 T para citocinas pleiotrópicas que atuam em praticamente cada tipo de célula do sistema
831 imunológico inato e adaptativo. Durante muito tempo, a IL-15 foi vista como uma citocina que
832 desempenha principalmente um papel na homeostase imune, nomeadamente nas células NK e
833 na memória das células T.

834 A IL-15 funciona principalmente de maneira dependente do contato celular através da
835 representação *trans* dos complexos IL-15–IL-15R α (subunidade α do receptor de IL-15)
836 ligados às membranas das células respondentes que expressam IL-2/IL-15R β –
837 Γ_c (WALDMANN, 2006). A sinalização por apresentação *cis* ou por complexos solúveis de
838 IL-15 – IL-15R α (BERGAMASCHI *et al.*, 2012) também contribui, mas em menor grau, para
839 as respostas induzidas por IL-15.

840 A sinalização do receptor IL-15 induz a ativação de JAK1 (Janus quinase 1) – STAT3
841 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) e ativação de JAK3 – STAT5 através da cadeia
842 β e γ c, respectivamente (MISHRA *et al.*, 2014). A IL-15 é notável entre as citocinas por ser
843 produzida por uma ampla gama de células (MISHRA *et al.*, 2014) incluindo células não
844 mieloides, como células epiteliais e estromais, células apresentadoras de antígenos e outras
845 células mieloides, como mastócitos, células B e células T das células da imunidade adaptativa.

846 Além disso, a IL-15 pode ser induzida em resposta a gatilhos microbianos inatos
847 (COLPITTS *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2007) e sob condições de inflamação estéril, refletindo
848 a presença de sofrimento celular contínuo (ABADIE, JABRI, *et al.*, 2014). Notavelmente, a
849 maioria, se não todos, os distúrbios autoimunes específicos de órgãos estão associados à
850 superexpressão de IL-15 no tecido afetado (BOUCHAUD *et al.*, 2013). A ausência de IL-15
851 em tumores sólidos está associada à ativação defeituosa de linfócitos no ambiente tumoral e à
852 diminuição da sobrevida do paciente, o que também apoia um papel da IL-15 na imunidade e
853 destruição dos tecidos (MLECNIK *et al.*, 2014).

854

855 **2.5.5 IL-18**

856

857 A interleucina-18 (IL-18) é uma citocina que foi originalmente identificada como um
858 fator pró-inflamatório indutor de IFN- γ . Existem evidências crescentes que demonstram efeitos
859 não imunológicos em relação às funções fisiológicas (OKAMURA *et al.*, 1995; REDDY *et al.*,
860 2004).

861 A IL-18 é produzida como um precursor inativo de 24 kDa e é processada por
862 inflamassomas em uma forma madura de 18 kDa ativa (SUGAWARA *et al.*, 2001).

863 A interleucina-18 (IL-18) tem efeitos imunomoduladores potentes. É a única citocina
864 com capacidade única de induzir a polarização de Th1 ou Th2, dependendo do contexto
865 imunológico. Os níveis séricos de IL-18 estão aumentados em muitas doenças humanas e estão
866 implicados na patogênese de vários processos imunomediados (REDDY *et al.*, 2004).

867 Estudos anteriores relataram que camundongos com deficiência de IL-18
868 desenvolveram hiperfagia, obesidade e resistência à insulina (NETEA *et al.*, 2006). Em estudos
869 em humanos, a concentração sérica de IL-18 foi significativamente maior em pacientes com

870 diabetes mellitus tipo 2 e com síndrome metabólica do que em controles saudáveis
871 (YAMAOKA-TOJO *et al.*, 2011).

872 A IL-18 é uma potente citocina pró-inflamatória capaz de induzir IFN- γ , GM-CSF,
873 TNF α e IL-1 em células imunocompetentes, ativar a morte por linfócitos e regular a expressão
874 de certos receptores de quimiocinas (NAKANISHI *et al.*, 2001).

875 A IL-18 também é essencial para conduzir defesas contra infecções graves
876 (NAKANISHI *et al.*, 2001).

877 Em particular, a depuração de bactérias intracelulares, fungos e protozoários requer a
878 indução de IFN- γ derivado do hospedeiro, que evoca moléculas efetoras, como o óxido
879 nítrico. Além disso, a IL-18 desempenha um papel na eliminação de vírus, em parte pela
880 indução de células T citotóxicas (NAKANISHI *et al.*, 2001).

881 A IL-18 também aumenta a rejeição do tumor por sua capacidade potente de aumentar
882 a atividade citotóxica das células NK e T *in vivo*. Em contraste, estudos recentes também
883 demonstram um papel convincente da IL-18 nas respostas atópicas, incluindo asma atópica. A
884 IL-18 induz células T a se desenvolverem em células Th2 (NAKANISHI *et al.*, 2001).

885 Além disso, a IL-18 também induz a produção de IL-13 e/ou IL-4 pelas células NK,
886 mastócitos e basófilos (NAKANISHI *et al.*, 2001).

887 Portanto, a IL-18 deve ser vista como uma citocina única que aumenta a imunidade inata
888 e as respostas imunes conduzidas por Th1 e Th2 (NAKANISHI *et al.*, 2001).

889

890 **2.5.6 IL-32**

891

892 O gene IL-32 foi identificado inicialmente por Kim et al. 2005 após a superexpressão
893 do receptor beta IL-18 em células de adenocarcinoma de pulmão humano, A549. O gene IL-32
894 é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos tipos de células imune, endotelial e epitelial e
895 é processada como variantes alternativas de emenda. Existem dados limitados descrevendo a
896 citocina IL-32 em cânceres; no entanto, existem evidências de que o gene é supressor em alguns
897 tipos de câncer e facilitador em outros tipos de câncer. A IL-32 demonstrou suprimir os
898 cânceres hepatocelulares, melanoma e câncer de cólon (KANG *et al.*, 2012).

899 A IL-32 é encontrada no cromossomo humano 16p13.3, é expressa em pelo menos 6
900 variantes de emenda (α , β , γ , δ , ϵ , ζ) e foi originalmente isolada de células T e NK ativadas

901 (KIM *et al.*, 2005). Os tipos de isoformas que são secretadas em oposição à ação intracelular
902 ainda não foram resolvidas e dificultadas por um receptor de superfície celular ainda não
903 identificado (HEINHUIS *et al.*, 2012). A isoforma γ é a única isoforma que possui uma
904 sequência líder, é composta por todos os exóons, acredita-se ser secretada e considerada a mais
905 biologicamente ativa (CHOI *et al.*, 2009). Apesar dessas lacunas em nosso conhecimento,
906 grande parte da literatura publicada sobre a biologia da IL-32 vem de experimentos utilizando
907 proteínas recombinantes disponíveis comercialmente, geralmente as isoformas α , β e γ
908 (HEINHUIS *et al.*, 2012).

909 A citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina-32 (IL-32), conhecida por melhorar
910 as respostas das células NK e das células T, também está elevada em neoplasias malignas
911 humanas e está ligada a maus resultados clínicos (BHAT *et al.*, 2017).

912 A IL-32 é expressa por vários tipos de células e é conhecida por induzir potentemente a
913 expressão de outras moléculas inflamatórias, como o TNF alfa (TNF α) (JOOSTEN *et al.*
914 2013).

915 Em um estudo anterior a alta expressão de IL-32 correlacionou-se positivamente com
916 os níveis de IFN- γ , CCL5, GNLV e TBX21 (BHAT *et al.*, 2017).

917 Em um estudo anterior foi demonstrado que a IL-32 está envolvida em mecanismos de
918 defesa relacionados ao sistema imunológico (NETEA *et al.*, 2006).

919 Estudos relacionados a mecanismos mostram que a IL-32 é induzida por NF-kappa-B
920 (BAI *et al.*, 2011).

921 Vários temas emergem sobre a biologia da IL-32: (a) IL-32 pode modular a produção
922 de várias citocinas, incluindo IL-1 β (KHAWAR; ABBASI; SHEIKH, 2015), TNF- α (KIM *et*
923 *al.*, 2005), IL-6 (KANG *et al.*, 2012), IL-8 (PARK *et al.*, 2014) e pode ativar células do sistema
924 imunológico (PARK *et al.*, 2012; NETEA *et al.*, 2008); (b) a expressão de IL-32 pode ser
925 induzida por vários vírus e micro-organismos (JOOSTEN *et al.*, 2013; BAI *et al.*, 2015) e pode
926 desempenhar um papel na imunidade antiviral (PALSTRA *et al.*, 2018); (c) IL-32 pode ter
927 efeitos diretos em várias células cancerígenas *in vitro* (LEE *et al.*, 2016); (d) IL-32 pode
928 desempenhar um papel na imunidade tumoral (HEINHUIS *et al.*, 2015) e (e) IL-32 foi
929 associada a várias doenças inflamatórias (KHAWAR *et al.*, 2015), como colite ulcerosa e artrite
930 reumatoide (HEINHUIS *et al.*, 2012). A partir de estudos imuno-histoquímicos, a IL-3 é
931 expressa por uma ampla gama de malignidades epiteliais e hematopoiéticas e geralmente esteja

932 correlacionada com a biologia agressiva, embora nenhum mecanismo unificador tenha sido
933 identificado (PAZ *et al.*, 2019).

934 Ao correlacionar as interleucinas citadas podemos observar que a IL-12 pode melhorar
935 a ativação de células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos (CTLs), promovendo a
936 produção de interferon-gama (IFN- γ) e induzir a diferenciação de células T auxiliares.
937 Semelhantemente, a IL-18 foi reconhecida pela primeira vez como fator indutor de interferon
938 (IFN)- γ e ativador de células NK (*natural killer*) e células Th1, que estão intimamente
939 relacionadas à imunidade do tipo 1. Durante muito tempo, a IL-15 foi vista como uma citocina
940 que desempenha principalmente um papel na homeostase imune, nomeadamente nas células
941 NK e de memória das células T como a IL-12, IL-18, IL-32 e IL-35. As citocinas pró-
942 inflamatórias, como a Interleucina-32 (IL-32), são conhecidas por melhorar as respostas das
943 células NK e das células T.

944

JUSTIFICATIVA

Tese de Doutorado – Juliana Barbosa de Faria

945 **3 JUSTIFICATIVA**

946 Sabendo que pacientes com doenças periodontais apresentam maior probabilidade de
947 desenvolver peri-implantite, é importante traçar um perfil de resposta imunológica que compare
948 essas doenças em um mesmo paciente, com a finalidade de prevenir insucessos na evolução da
949 ósseo-integração dos implantes dentários.

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

OBJETIVOS

980 **4 OBJETIVOS**

981 **4.1 OBJETIVO GERAL**

982 Avaliar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival (FCG) de
983 pacientes com gengivite e periodontite, antes da instalação do implante, e fluido crevicular peri-
984 implantar (FCPI) de pacientes com peri-implantite, um ano após a instalação do implante.

985
986 **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

987 Ao comparar o fluido peri-implantar de pacientes com gengivite, periodontite e peri-
988 implantite, tivemos como objetivos:

- 989 • Avaliar os níveis de citocinas entre pacientes do grupo controle e de pacientes com
990 gengivite, periodontite e peri-implantite;
- 991 • Avaliar os níveis das citocinas IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 nos momentos antes e após
992 a instalação do implante;
- 993 • Avaliar os níveis de citocinas comparando os momentos antes e depois da instalação
994 do implante, entre os voluntários controle e aqueles com doença periodontal (gengivite
995 e/ou periodontite).

996

997

998

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005

1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026

RESULTADOS

1027 **5. Resultados**

1028

1029 **5.1 ARTIGO**

1030

1031 **Título: Immunological Evaluation of the Crevicular Fluid in Patients with Gingivitis,**
1032 **Periodontitis, and Peri-Implantitis: A 1-Year Cross-Sectional Study**

1033

1034 Situação:

1035 • Revista: Research, Society and Development:

1036 • Aceito em 02 de outubro de 2021;

1037 • Publicado em 04 de outubro de 2021.

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087

ARTIGO

1088 **Artigo**

1089

1090 **Immunological Evaluation of the Crevicular Fluid in Patients with**
1091 **Gingivitis, Periodontitis, and Peri-Implantitis: A 1-Year Cross-Sectional**
1092 **Study**

1093

1094 **Avaliação Imunológica do Fluido Crevicular em Pacientes com Gengivite, Periodontite e**
1095 **Peri-implantite: um estudo transversal de 1 ano**

1096 **Evaluación inmunológica del líquido crevicular en pacientes con gingivitis, periodontitis**
1097 **y periimplantitis: un estudio transversal de 1 año**

1098

1099

Received: 09/17/2021 | Reviewed: 09/27/2021 | Accept: 10/02/2021 | Published: 10/04/2021

1100

Juliana Barbosa de Faria

1101

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9681-2278>

1102

Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil.

1103

E-mail: julibfaria@hotmail.com

1104

Taíssa Cássia de Souza Furtado

1105

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8186-1798>

1106

Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, FORP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

1107

E-mail: taissacassia@hotmail.com

1108

Thaís Soares Farnesi de Assunção

1109

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3415-9004>

1110

Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil.

1111

E-mail: thais.assuncao@uftm.edu.br

1112

Douglas Reis Abdalla

1113

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6971-1201>

1114

Faculty of Human Talents / UniBrasília (FACTHUS), Uberaba, MG, Brazil

1115

E-mail: profdouglasabdalla@gmail.com

1116

Fabiane Minin Andrade

1117

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6156-3988>

1118

University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil.

1119

E-mail: fabianeminin@gmail.com

1120

Bárbara Bellocchio Bertoldo

1121

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0628-9792>

1122

Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil.

1123

E-mail: barbarabellocchiob@hotmail.com

1124

Eleonora de Paula Amaral

1125

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3107-2002>

1126

University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil.

1127

E-mail: eleonoramaral@yahoo.com

1128

Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

1129

ORCID: 0000-0003-4003-542X

1130

University of Uberaba (UNIUBE), Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil

1131

E-mail: denise.rodrigues@uniube.br

1132

Virmondes Rodrigues Júnior

1133

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8706-4223>

1134

Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil.

1135

E-mail: virmondes.rodrigues@uftm.edu.br

1136

Sanívia Aparecida de Lima Pereira

1137

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2587>

1138

University of Uberaba (UNIUBE), Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG, Brazil

1139

E-mail: sanivia.pereira@uniube.br

1140

1141

1142

1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179

1180

1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196

Abstract

Objective: To assess the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) and peri-implant crevicular fluid (PICF) in patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis before and one year after implant installation. Material and Methods: Forty-nine samples of GCF and PICF were collected from March 2018 to March 2019. The patients were classified: patients with gingivitis (n=7), patients with periodontitis (n=14), patients with peri-implantitis (n=4) and healthy patients (n=24). The crevicular fluid from the 49 patients was collected before implant installation (n=8) and one year after implant placement (n=8). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to evaluate the levels of cytokines in crevicular fluid. Results: Patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis showed higher concentrations of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 when compared with control group. In general, the levels of IL-12 and IL-15 increased when compared to the moments before and after implant installation. There was also an increase in the concentration of IL-18 in the control group volunteers after implant installation. Conclusion: The results and methodology of this study showed that there was no difference in the synthesis of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in healthy individuals or in those with periodontal injuries. However, there was an increase in the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 one year after implant installation, which would be increasing the inflammatory activity in peri-implantitis.

Keywords: Cytokines; Periodontal diseases; Gingival Crevicular Fluid; Peri-Implantitis.

Resumo

Objetivo: Avaliar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival (FCG) e peri-implantar (FCPI) de pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite antes e um ano após a instalação do implante. **Material e Métodos:** Quarenta e nove amostras de FCG e FCPI foram coletadas entre março de 2018 a março de 2019. Os pacientes foram classificados de acordo com a situação periodontal ou peri-implantar: pacientes com gengivite (n=7), pacientes com periodontite (n=14), pacientes com peri-implantite (n=4) e pacientes saudáveis (n=24). Desses 49 pacientes, foi coletado fluido crevicular antes da instalação do implante (n=8) e um ano após a instalação do implante (n=8). O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi usado para avaliar os níveis de citocinas no fluido crevicular. **Resultados:** Pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite apresentaram maiores concentrações de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 quando comparados ao grupo controle. Em geral, os níveis de IL-12 e IL-15 aumentaram quando comparados aos momentos antes e após a instalação do implante. Também houve aumento na concentração de IL-18 nos voluntários do grupo controle após a instalação do implante. **Conclusão:** Os resultados e a metodologia deste estudo mostraram que não houve diferença na síntese de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 em indivíduos saudáveis ou com lesão periodontal. Porém, houve aumento das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 um ano após a instalação do implante, o que estaria aumentando a atividade inflamatória na peri-implantite.

Palavras-chave: Citocinas; Doenças Periodontais; Líquido do Sulco Gengival; Peri-implantite.

Resumen

Objetivo: Evaluar los niveles de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en el líquido crevicular gingival (LCG) y en el líquido crevicular periimplantar (LCP) de pacientes con gingivitis, periodontitis y periimplantitis antes y un año después de la colocación del implante. Material y métodos: Se recogieron 49 muestras de FCG y FCPI entre marzo de 2018 y marzo de 2019. Los pacientes se clasificaron según el estado periodontal o periimplantario: pacientes con gingivitis (n=7), pacientes con periodontitis (n=14), pacientes con periimplantitis (n=4) y pacientes sanos (n=24). De estos 49 pacientes, se recogió líquido crevicular antes de la instalación del implante (n=8) y un año después de la instalación del implante (n=8). Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar los niveles de citoquinas en el líquido crevicular. Resultados: Los pacientes con gingivitis, periodontitis y periimplantitis presentaban mayores concentraciones de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en comparación con el grupo de control. En general, los niveles de IL-12 e IL-15 aumentaron en comparación con los momentos anteriores y posteriores a la instalación del implante. También se produjo un aumento de la concentración de IL-18 en los voluntarios del grupo de control tras la instalación del implante. Conclusión: Los resultados y la metodología de este estudio mostraron que no había diferencias en la síntesis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en sujetos sanos

1197 o en sujetos con lesiones periodontales. Sin embargo, hubo un aumento de las citocinas IL-12, IL-15 e
1198 IL-18 un año después de la instalación del implante, lo que aumentaría la actividad inflamatoria en la
1199 periimplantitis.

1200 **Palabras clave:** Citoquinas; enfermedades periodontales; líquido del surco gingival; periimplantitis.

1201

1202

1203

1. Introduction

1204

1205 Periodontal diseases are inflammatory processes that start in the gingiva as a response to bacterial antigens
1206 that accumulate on the dental plaque throughout the gingival margin. The plaque is a biofilm formed by bacteria,
1207 salivary proteins, and desquamated epithelial cells. Bacteria trigger the production of cytokines and chemokines
1208 on the gingival epithelium, leading to the expression of adherence molecules and to the increase of the permeability
1209 of gingival capillaries and of the chemotaxes of neutrophils through the junctional epithelium into the gingival
1210 sulcus (Silva et al., 2015). The earlier manifestation of the periodontal disease is gingivitis, which is characterized
1211 by hyperemia, edema, and gingival bleeding. When gingivitis is not treated early, it can evolve into a periodontitis,
1212 which is characterized by the loss of the insertion of the periodontal tissue that gives support and protection to the
1213 dental element. Therefore, the periodontitis affects deeper structures, causing the resorption of the collagen fibers
1214 of the periodontal ligament, the resorption of the alveolar bone, abscesses, increase of the gingival sulcus depth,
1215 greater tooth mobility, and loss of the dental element (Zhang et al., 2020).

1216 The progression of the periodontal disease does not depend only on the bacteria, but also on the
1217 immunological response. Consequently, the immune response of the host has an essential role in the balance
1218 between the destruction and the recovery of the periodontal tissue. Therefore, current researches about periodontal
1219 diseases have focused on the immunological responses involved in them (Zhang et al., 2020).

1220 On the other hand, the bacteria in the biofilm can also provoke revertible inflammation on the mucosa
1221 that surrounds dental implants (peri-implant mucositis) and irreversible injuries in the tissue that sustains these
1222 implants (peri-implantitis) (Rinke et al., 2020). This can trigger marginal bleeding, mobility, and loss of the
1223 implanted dental element, compromising both aesthetic and function. Similarly to periodontal diseases, the
1224 cytokines released in the site contribute for the progress of these diseases (Ali et al., 2021). However, these peri-
1225 implant diseases are still not fully understood. So far there is no consensus on the etiologies and pathogenesis,
1226 especially when compared to periodontitis (Kalsi, Moreno, & Petridis, 2021).

1227 However, the installation of dental implants brings great benefits to patients and has contributed to
1228 reducing the number of edentulous patients worldwide. The treatment of edentulism with dental implants is a
1229 routine treatment in daily dental practice and is becoming more and more widespread over the years (Kormas et
1230 al., 2020). Although there has been a great advance in the area of these implants in recent years, the number of
1231 failures related to inflammation of the peri-implant tissue has also increased. Currently, the prevalence of
1232 periimplant diseases is high, with 43% progressing to periimplant mucositis and 22% progressing to periimplantitis
1233 (Rinke et al., 2020).

1234 The number of studies in this area is growing in order to understand the immunological mechanism
1235 involved in the progression of these diseases, since the assessment of inflammatory cytokine levels in periodontal

1236 and peri-implant diseases can allow the identification of the active disease, contributing to the diagnosis and early
1237 treatment (Ali et al., 2021).

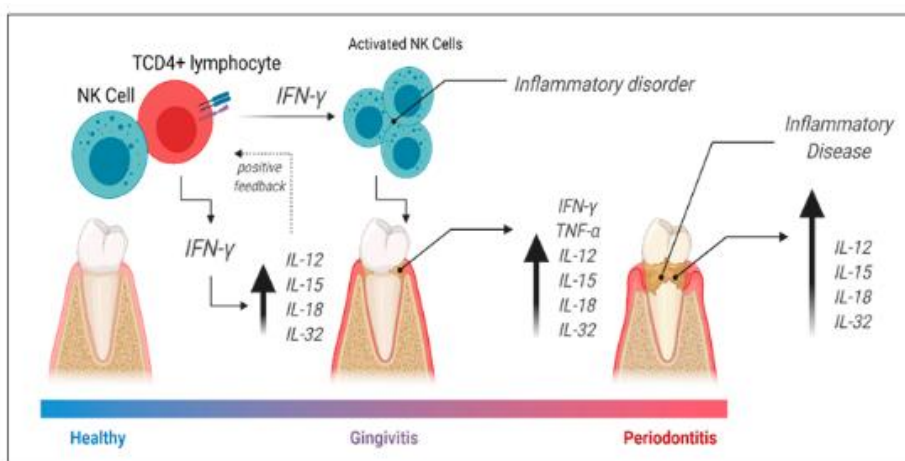
1238 The present study was carried out aiming to contribute for the understanding of tissue injury in gingivitis,
1239 periodontitis, and peri-implantitis, starting from the principle that interleukins (IL) and other cytokines stimulate
1240 cells from several different lineages and differentiation stages.

1241 Figure 1 summarizes the behavior of the immune response during the establishment and development of
1242 the periodontal lesion. During gingivitis and, later, periodontitis, immune cells, such as TCD4+ lymphocytes and
1243 NK cells are activated and produce IFN- γ , a key cytokine for other interleukins to be activated, such as IL-12, IL-
1244 15, IL-18, and IL-32 (Zhuang et al., 2018). Once these cytokines are produced, a feedback loop is activated, more
1245 IFN- γ is produced and more NK cells are activated, creating a serious inflammatory disorder (Pradeep et al., 2009).
1246 This disorder is characterized by high levels of IL-12, IL-15, IL-18, IL-32, which are proinflammatory cytokines,
1247 related to the liberation of other proinflammatory cytokines (IFN- γ and TNF- α) (Nakanish et al., 2001) and
1248 chemokines. This group of cytokines (Interleukins 12, 15, 18, and 32) have proteolytic action, thus acting in the
1249 progression of inflammatory diseases such as gingivitis and periodontitis (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007).

1250

1251

Figure 1: Relation between IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32.



1252

1253

1254

Source: the authors, 2021. Created by BioRender.com

1255 Although there are studies that evaluated the immune response in periodontal and peri-implant tissues
1256 (Ali et al., 2021), this is the first study to simultaneously compare the levels of IL-12, IL-15, IL-18 and IL-32 in
1257 the crevicular fluid from patients with gingivitis, periodontitis and periimplantitis. Also, the first study to compare
1258 all these cytokines simultaneously, before and one year after the installation of dental implants.

1259 As all the immunological mechanisms involved in these diseases are not yet understood, the results of the
1260 present study will allow us to bring new knowledge for better understanding of the pathogenesis of periodontal
1261 and peri-implant diseases. This study can contribute to a better quality of life for people, since the understanding
1262 of the mechanisms of these diseases can collaborate in the adoption of prophylactic and therapeutic measures in

1263 order to prevent the loss of teeth and dental implants. Knowing the importance of teeth for aesthetic, mastication,
1264 and phonetics is enough to justify the need to understand the pathogenesis of these diseases.

1265 Therefore, the objective of this study was to evaluate the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the
1266 gingival fluids of patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis, before the extraction of the teeth and
1267 one year after the placement of dental implants.

1268

1269 **2. Methodology**

1270

1271 *Selection of patients*

1272

1273 This prospective cross-sectional study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the
1274 University of Uberaba/MG, Brazil, under protocol number 2.457.394, CAAE: 64947717.0.0000.51. All eligible
1275 patients were informed about the nature of the study and about the potential risks and benefits of participating by
1276 signing the Informed Consent Form. The clinical investigation was carried out according to the principles from
1277 the Declaration of Helsinki. The patients were selected during the peri-implant support therapy, from March 2018
1278 to March 2019, in the Getúlio Vargas Polyclinic from the University of Uberaba/MG, in Uberaba, Minas Gerais,
1279 Brazil. Medical and odontological information were obtained from the patients, who agreed participating in the
1280 study and were in accordance with the inclusion/exclusion criteria.

1281 Forty-nine patients were selected and classified according to their periodontal situation: patients with
1282 gingivitis (n=7), patients with periodontitis (n=14), patients with peri-implantitis (n=4), and healthy patients
1283 (n=24). The crevicular fluid from the 49 patients was collected before (n=8) and one year the placement of the
1284 implant (n=8). In this group (n=8) the patients were classified according to their periodontal situation: patients
1285 with gingivitis (n=4), patients with periodontitis (n=3), patients with peri-implantitis (n=1).

1286 For the selection criteria of teeth and implant for collection, the tooth and implant with the greatest
1287 probing depth were selected. Importantly, all patients in the study received implants and most patients had more
1288 than one implant in their oral cavity. When a patient had periodontitis or peri-implantitis in more than one site, the
1289 one with the greatest probing depth was selected.

1290 The inclusion criteria for the selection of patients were: 1. Healthy patients: absence of gingival erythema,
1291 bleeding on probing, edema, suppuration, and no increase in probing depth when compared to previous exams
1292 (Berglundh et al., 2018). Furthermore, the patients had to be in a good general state of health, not having para-
1293 functional habits, and sign the Free and Informed Consent Form; 2. Patients with gingivitis: probing depths of up
1294 to 3mm, 10% or more places with bleeding on probing, no clinical attachment loss or radiographic bone loss
1295 (Chapple et al., 2018); 3. Patients with periodontitis: clinical attachment loss detected in one or more interproximal
1296 non-adjacent sites or loss of insertion of 3mm or more in the vestibule or lingual/palate in at least two teeth, as
1297 long as not caused by: a) traumatic gingival recession; b) dental cavity reaching the cervical area of the teeth; c)
1298 loss of insertion in the distal surface of a second molar and associated to the bad position or extraction of a third
1299 molar; d) endoperiodontal lesion draining through the marginal periodontium or e) vertical root fracture (Tonetti,

1300 Greenwell, & Kornman, 2018; Papapanou et al., 2018); 4. Patients with peri-implantitis: a) signs of peri-implant
1301 inflammation (gingival erythema, bleeding at probing, edema, suppuration, and increase in probing depth when
1302 compared to previous exams), b) radiographic evidence of bone loss after initial healing, and c) radiographic bone
1303 level ≥ 3 mm accompanied by bleeding at probing and probing depth ≥ 6 mm (Renvert et al., 2018).

1304 The exclusion criteria to select the patients were: prior periodontal or peri-implant therapy for at least one
1305 year, relevant systemic diseases not-compensated for, such as diabetes and osteoporosis; the use of antibiotics or
1306 anti-inflammatory in the last six months; smoking; chronic alcoholics; pregnant women; implants with mobility
1307 or suppuration, and those who did not accept signing the Consent Form (De Araújo et al., 2017).

1308 The following parameters were evaluated in six sites of each implant (mesial-vestibular, vestibular, disto-
1309 vestibular, mesial-lingual, lingual, and disto-lingual), using a periodontal probe (PCPUNC-15BR Hu-Friedy, São
1310 Paulo, Brazil): (a) marginal bleeding - the presence or absence of bleeding was recorded by passing of the
1311 periodontal probe alongside the margins of the soft tissue; (b) suppuration - presence or absence of suppuration,
1312 spontaneous or when probing; (c) probing depth - distance in millimeters from the margin of the mucosa to the
1313 bottom of the sulcus or the peri-implant pocket (De Mendonça et al., 2009).

1314

1315 *Collection of peri-implant and gingival fluid*

1316

1317 For the collection of gingival and peri-implant fluid, selected teeth or implants were isolated using sterile
1318 gauze and the collection places were softly dried with an air syringe. Four absorbent paper points number 40 were
1319 placed, isolated, in each place of collection (mesial-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesial-lingual, lingual,
1320 disto-lingual), for approximately 2 mm in the sulcus/pocket for 30 seconds each. Points contaminated by blood or
1321 saliva were discarded. Later, the points were placed in an eppendorf tube with a 0.5 Phosphate-Buffered Saline
1322 (PBS) buffer solution, pH 7.2, composed by 1.9g monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), 5.1 g sodium
1323 phosphate (Na_2HPO_4), 42.5 g sodium chloride (NaCl), and 500 ml ultrapure water, distilled in a Milli Q®
1324 (Millipore) device and frozen at -70°C (Escobar et al., 2018).

1325

1326 *Quantification of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) and the peri-implant* 1327 *crevicular fluid (PICF)*

1328

1329 The samples collected were analyzed through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to
1330 determine the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 using specific antibody pairs commercially available,
1331 according to the recommendations of the manufacturer (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). The
1332 following kits from R&D Systems were used: a) Human IL-12 p70 Quantikine ELISA Kit – listing number:
1333 D1200; b) Human IL-15 Quantikine ELISA Kit – listing number: D1500; c) Human Total IL-18 DuoSet ELISA
1334 – listing number: DY318-05; d) Human IL-32 DuoSet ELISA – listing number: DY3040-05. High-sensitivity 96
1335 well flat bottom plates (Microplate, PS, half area, high binding, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
1336 Germany). Later, they were cleaned using PBS/Tween 0.05% in an automated cleaner, blocked with 150 μl of

1337 PBS/BSA 1% (at least one hour, room temperature) and cleaned again using PBS/Tween 0.05%. The samples
1338 were added to the wells of the plates and, in parallel, a standard curve was incorporated through serial dilutions of
1339 the respective recombinant cytokine. The samples throughout the curve were incubated through night at 4°C. The
1340 wells were then cleaned using PBS/Tween 0.05% and, later, 50 µl/well were inserted with their respective
1341 detection antibodies. They remained for three hours in room temperature and were later cleaned using the
1342 PBS/Tween 0.05%. After this stage, 50 µL/well of alkaline phosphatase were pipetted with streptavidin in
1343 PBS/BSA 1%, remaining in room temperature and protected from direct light for two hours. Later, the plates were
1344 cleaned using PBS/Tween 0.05%, after which 50µl/well of the substrate solution were added. The reaction was
1345 interrupted using a 2N of H₂SO₄ solution. The results were found using absorbance measures of 450 nm and 570
1346 nm in an automated ELISA reader (Enspire, Perkin Elmer, EUA). The concentrations of the mediators were
1347 determined using a linear regression with the absorbance values found in the curves and expressed in pg/mL. The
1348 results were calculated using standard curves created in each assay, and the absorbance was found comparing the
1349 difference between the first and the second wavelengths (R&D SYSTEMS, 2020). The ELISA assay was blind.

1350

1351 *Quantification of total proteins (TPs)*

1352

1353 The concentration of cytokines indicated by the automated ELISA reader (Enspire, Perkin Elmer, USA)
1354 was corrected according with the total concentration of total proteins (TPs) in the crevicular fluid. To do so, 2 µL
1355 of the sample of crevicular fluid were analyzed in a Spectrophotometer NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher
1356 Scientific, Wilmington, DE, EUA). The samples were considered adequately pure when the ratio between
1357 absorbances, for 230nm (Green & Sambrook, 2018).

1358

1359 *Statistical Analysis*

1360

1361 The statistical analysis was carried out using Excel 2013 for Windows (Microsoft - EUA), GraphPad
1362 Prism, version 8. The Shapiro-Wilk Test was used to verify the normal distribution of the quantitative variables.
1363 The continuous variables, which present normal distribution, were expressed in mean ± standard deviation. For
1364 the multiple comparisons, the ANOVA test and Tukey's test were used. Student's t-test was used for single
1365 comparisons. Variables that did not have normal distribution were expressed in median, minimum, and maximum.
1366 For the multiple comparisons, the Kruskal-Wallis and Dunn's tests were used. For single comparisons, Mann-
1367 Whitney's test was used. The significance level assumed for the variables was 5% ($\alpha=0.05$).

1368

1369 **3. Results**

1370 The concentration of cytokine dosages between control voluntaries and those affected by gingivitis,
1371 periodontitis, and peri-implantitis can be seen in table 1. There were no statistically significant differences
1372 regarding the concentrations of IL-12 ($p=0.5222$), IL-15 ($p=0.8463$), IL-18 ($p=0.9980$), and IL-32 ($p=0.4039$)
1373 between the control volunteers and those affected by gingivitis, periodontitis, or peri-implantitis (Table 1).

1374 Table 1 - Representation of the dosage of cytokine in control group patients and those with gingivitis,
1375 periodontitis, and peri-implantitis.

	IL-12 ^a (n=49)	IL-15 ^b (n=49)	IL-18 ^c (n=49)	IL-32 ^d (n=49)
Control	23.7 (2.7-363.5)	34.1 (5.7-263.5)	24.6 (4.0-213.5)	12.2 (0.0-711.6)
Gingivitis	19.8 (7.3-57.4)	30.3 (9.0-60.0)	22.5 (19.0-39.7)	7.3 (0.0-73.7)
Periodontitis	38.9 (5.4-97.1)	39.1 (8.0-75.7)	26.6 (3.7-51.79)	0.0 (0.0-124.8)
Peri-Implantitis	17.0 (12.9-46.3)	24.2 (20.3-48.4)	24.1 (17.1-33.5)	7.0 (0.0-136.8)

1376 ^a Kruskal-Wallis test with $p=0.5222$;

1377 ^b Kruskal-Wallis test with $p=0.8463$.

1378 ^c Kruskal-Wallis test with $p=0.9980$;

1379 ^d Kruskal-Wallis test with $p=0.4039$.

1380 Source: the authors, 2021.

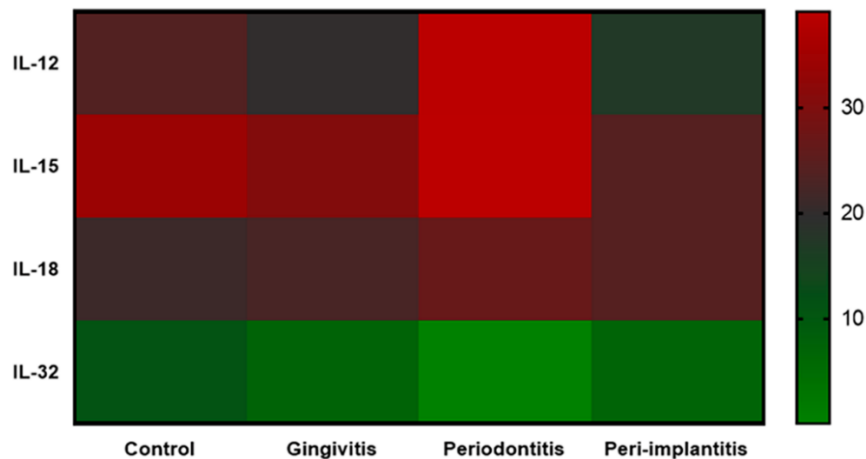
1381

1382 Figure 2 is a residual representation of the dosage of interleukins, to show that the concentrations of
1383 cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 were higher in the crevicular fluid of the group with periodontitis, when
1384 compared to the other groups.

1385

1386 **Figure 2:** Heat map representation of cytokines IL-12, IL-15, IL-18 E IL-32, comparing the experimental group
1387 volunteers (n=49)

1388



1389

1390

Source: the authors, 2021.

1391

1392

1393

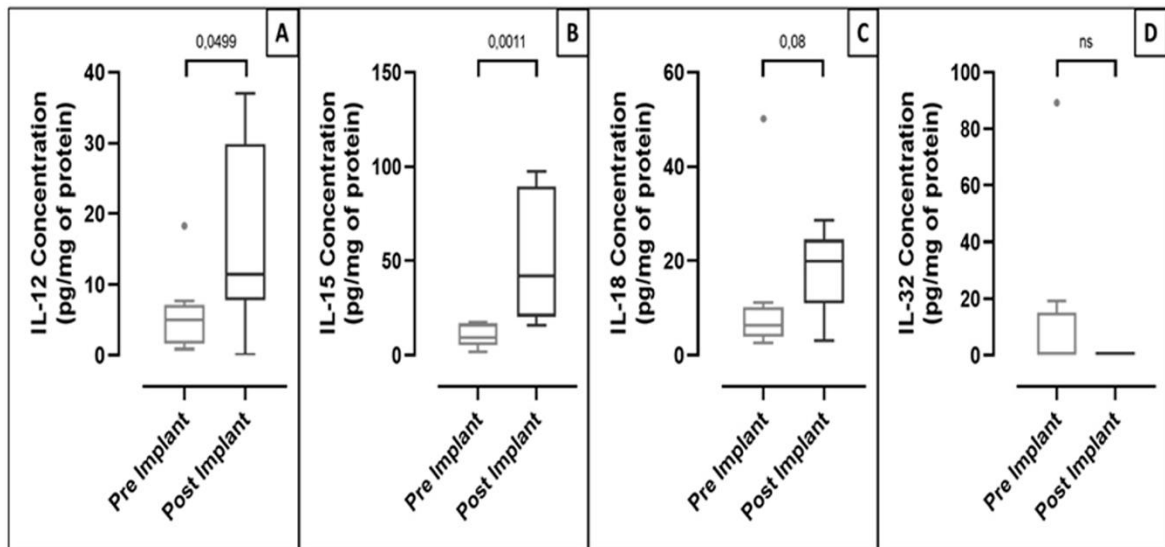
1394

Regarding the expression of cytokines IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 between volunteers who received implants, figure 3 shows the analysis of the moments before the implant and one year after the implant. The levels of IL-12 ($p=0.0499$) and IL-15 ($p=0.0011$) increased after the implant, as shown in images 3A and 3B, respectively. The concentrations of IL-18 ($p=0.08$) also increased when the moment before the implant was

1395 compared with one year later (Figure 3C), there was no statistically significant difference. Finally, the IL-32 were
 1396 lower after one year of the implant, albeit with no statistical difference (Figure 3D).

1397

1398 **Figure 3** - Representation of the dosages of cytokines comparing the moments before and after the implant. ^aMann
 1399 Whitney, IL-12: $p=0,0499$; ^bMann Whitney, IL-15: $p=0,0011$; ^cMann Whitney, IL-18: $p=0,08$; ^dMann Whitney,
 1400 IL-32: $p=1$; (n=8)



1401

1402

Source: the authors, 2021.

1403

1404 Figure 4A shows the cytokines IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 before and after the implant, between
 1405 control volunteers and those with periodontal injuries (gingivitis and/or periodontitis). Regarding the IL-12
 1406 dosages, in figure 4A, this cytokine increased after the implant, both for control volunteers and for volunteers with
 1407 periodontal injuries. However, this result was not statistically significant. The dosages of IL-15 (Figure 4B)
 1408 increased after the implant in both groups. However, in the control group, this increase trended towards a
 1409 statistically significant result ($p=0.0512$), while in the group with periodontal injuries there was a significant
 1410 increase in IL-15 concentration ($p=0.0407$). Finally, there was also an increase in the IL-18 concentration
 1411 ($p=0.0153$) among control volunteers, when the moments before and after the implant were compared (Figure
 1412 4C).

1413

1414

1415

1416

1417

1418

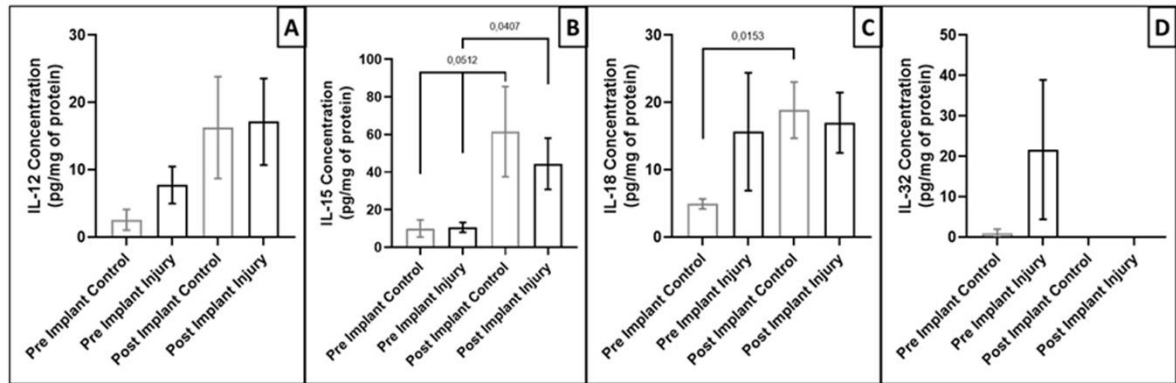
1419

1420

1421

1422

1423 **Figure 4** - Representation of the dosages of cytokines, comparing moments before and after the implant, between
 1424 control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis). ^bKruskal-Wallis test and Dunn's post
 1425 test, IL-15: $p=0.0512$ before implant control vs. after implant control; ^bKruskal-Wallis test and Dunn's post test,
 1426 IL-15: $p=0.0407$ before implant lesion vs. after implant lesion; ^cKruskal-Wallis test and Dunn's post test, IL-18:
 1427 $p=0.0153$ before implant control vs. after implant control; (n=8)

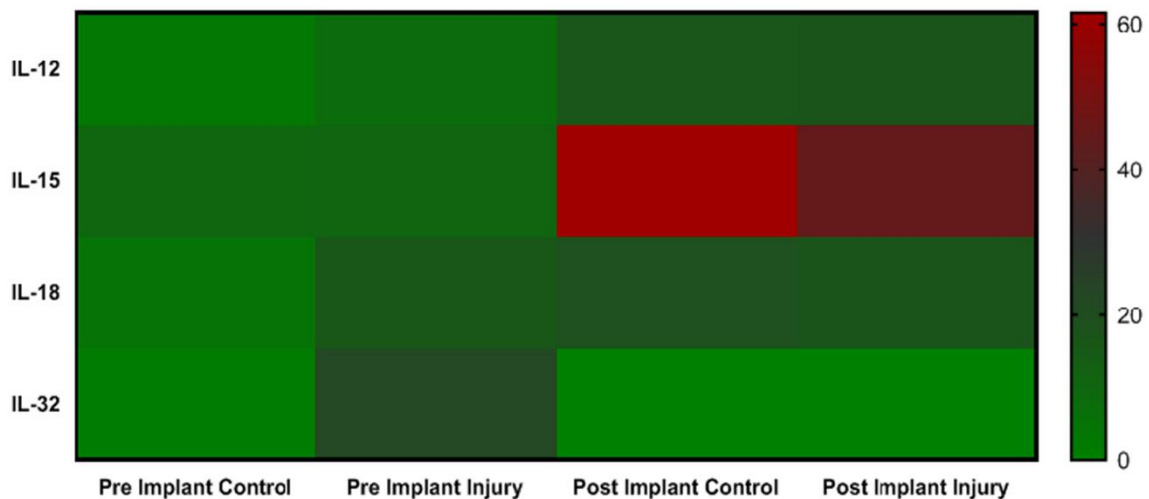


1428
 1429

Source: the authors, 2021.

1430 Regarding figure 5, it is a residual representation of cytokine concentrations. It is possible to notice that
 1431 there was an increase in the concentration of the IL-12, IL-15, and IL-18 cytokines when we compare the moments
 1432 before the implant in control volunteers and in those with injuries (gingivitis and/or periodontitis). There was also
 1433 an increase in the concentration of cytokines IL-12 and IL-15, when the moment after the implant is compared
 1434 between control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis) (Figure 5).
 1435

1436 **Figure 5** - Heat map representation of cytokines IL-12, IL-15, IL-12, and IL-32, comparing moments before and
 1437 after the implant, between control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis) (n=8)



1438
 1439
 1440

Source: the authors, 2021.

1441 4. Discussion

1442

1443 The null hypothesis was not rejected in this study, since there was no significant difference between the
1444 cytokines analyzed in the control group and the groups with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis.
1445 Regarding the analysis of the cytokines before and after the implant, the null hypothesis was rejected for cytokines
1446 IL-12, IL-15, IL-18, because a significant difference was observed.

1447 We evaluated the patients one year after they had an implant placed, since the functional load can
1448 collaborate for marginal bone loss around the implants.⁴¹ According to the literature consulted, this is the first study
1449 that simultaneously compared the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF)
1450 of patients with gingivitis and periodontitis, in addition to the peri-implant crevicular fluid (PICF) in peri-
1451 implantitis, using the ELISA method.

1452 Our study did not observe statistically significant differences regarding IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32
1453 concentrations between control volunteers and those affected by gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis,
1454 corroborating a previous study in which the authors showed that the profile of proinflammatory cytokines (TNF-
1455 α , IL-1 β , TGF- β 2) in the periodontal tissue, measured by the method ELISA, was similar to the peri-implant tissue
1456 at three different points in time (0, 21, 90 days) after the placement of the implant (Schierano et al., 2008). A
1457 previous study found, opposed to these findings, that IL-12 and IL-18 induced severe inflammatory disturbance,
1458 suggesting that IL-18 is a potent proinflammatory cytokine with a physiopathological role in many inflammatory
1459 conditions (Pradeep et al., 2009). Furthermore, IL-32 is known to be secreted by several cells after the stimulation
1460 of some inflammatory cytokines, such as IL-12, IL-1b, IFN- γ , IL-18. The IL-32 is an inflammatory cytokine
1461 produced by lymphocytes, epithelial cells activated by IFN- γ , NK cells (Goda et al., 2006). Furthermore, the IL-
1462 32 acts over macrophages/monocytes, encouraging the synthesis of TNF- α and IL-6, as well as inducing the
1463 secretion of chemokines (IL-8 and MIP-2), being important in the triggering and persistence of the inflammatory
1464 process (Kim et al., 2005). Still regarding IL-32, this cytokine antagonizes the activation of NK cells to inhibit
1465 phosphorylation of STAT5 mediated by IL-15, suppressing its expression of an effector molecule induced by IL-
1466 15, with cytolytic capacity (Gorvel et al., 2017). IL-15, in turn, controls the liberation of IL-18 by human
1467 monocytes, creating a proinflammatory environment, as induced by IFN- γ (Sattler et al., 2015). The combination
1468 of IL-15 and IL-18 could induce the expression of IFN- γ and granzyme B, suggesting that when these cytokines
1469 act together, they are more potent (Ussher et al., 2013). Interleukins IL-15 and IL-32 contributed together to cause
1470 physiopathological events that include cell death, inflammation, allergy, and epithelial cell autoimmunity (Conti,
1471 Youinou, & Theoharides, 2007). Although the human recombinant IL-32 induces the production of many
1472 proinflammatory cytokines and chemokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007), our study suggests that IL-
1473 32 may have contributed for the non-activation of IL-12, IL-15, IL-18, inhibiting the levels of these cytokines in
1474 the gingival crevicular fluid (GCF) and in the peri-implant crevicular fluid (PICF).

1475 Cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 presented higher levels in the group with periodontitis when compared
1476 to the other groups. Furthermore, after the implant, there was an increase in the concentration of cytokines IL-12,
1477 IL-15, and IL-18 when compared to the moment one year after the implant, for both the control and injured

1478 patients. This can be made clear by the fact that the human NK cells show an adaptive behavior in response to a
1479 combination of proinflammatory cytokines, such as interleukins IL-12, IL-15, and IL-18. (Romee et al., 2016). All
1480 cytokines mentioned lead to the generation of NK cells with functional "memory" properties (Zhuang et al., 2018).
1481 It has been shown that the cell line of monocytes and macrophages can respond to the encouragement of IL-15,
1482 increasing IL-18 and IL-12 (Bannwart et al., 2007). Furthermore, the IL-18 is a cytokine responsible for the
1483 beginning and progression of the periodontal disease (Figueredo et al., 2008). Therefore, the periodontal
1484 inflammation may not be resolved successfully due to the accumulation of IL-18. A previous study showed that
1485 levels of IL-18 in GCF increased in places where there was periodontitis, suggesting that this cytokine is associated
1486 to the severity of the periodontal disease (Orozco et al., 2006). The same thing was verified in the previous study
1487 in which the IL-18 had an extremely important role in gingival inflammation and a strong expression of IL-18 was
1488 found in gingival samples with the increase of the sulcus depth (Johnson & Serio, 2005). Therefore, in our study,
1489 we suggest that this combination of IL-12/15/18 cytokines has the same function in the generation of NK cells.
1490 Furthermore, the activity of IL-18 often requires co-stimulating factors to respond, such as IL-12 or IL-15, which
1491 is why we believe that IL-18 may have interfered in the results of patients with periodontal diseases.

1492 The levels of IL-12 and IL-15 increased after the implant. Regarding the IL-12 dosages, this cytokine
1493 increased after the implant, both for control volunteers and for volunteers with periodontal injuries. However, this
1494 result was not statistically significant. The IL-15 dosages, comparing the moments before and after implant,
1495 increased for both groups. However, it also trended towards a significant increase in the control group. There was
1496 also an increase in the concentration of cytokines IL-12 and IL-15 when we compare the moment after the
1497 installation of the implant, comparing control volunteers and those who had injuries (gingivitis and/or
1498 periodontitis). The combination of IL-15 and IL-12 contributes for the production of IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF
1499 by human NK cells (Carson et al., 1995). Additionally, the synergy between IL-12 and IL-15 is responsible for
1500 inducing the response of Th1 cells against infections by intracellular microorganisms (Yoshikai & Nishimura,
1501 2000). Therefore, both IL-15 and IL-12, produced by activated human monocytes, had a critical role as cofactors
1502 in the production of IFN- γ by NK cells, which is important to activate monocytes and for the development of an
1503 effective innate immune response for infections, before the appearance of antigen-specific T cell responses (Carson
1504 & Caligiuri, 1998). As a result, we suggest that cytokines IL-12 and IL-15, which contribute for the production of
1505 IFN- γ , could be the key for the generation of NK cells, which are important components of innate bacteria
1506 immunity, acting in the development of inflammations due to their quick response and to their intimate relation
1507 with the production of proinflammatory cytokines, leading to peri-implantitis.

1508 There was a significant increase in IL-15 in the group with periodontal injuries. These results corroborate
1509 the previous study, according to which the total amount of IL-15 in the GCF of the group with gingivitis was
1510 significantly higher when compared to the healthy controls (Buduneli et al., 2003). Since the IL-15 is a proteolytic
1511 proinflammatory cytokine, it is superexpressed in several inflammatory diseases such as gingivitis and peri-
1512 implantitis. The proinflammatory cytokine IL-15 is more present in tissue injuries and in the fluids of chronic
1513 inflammatory diseases (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007). Furthermore, an *in vitro* study showed that IL-15
1514 induced the expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by peripheral blood monocytes. The authors

1515 found that IL-15, produced in inflammation sites, may play an essential role in the regulation of blood leukocytes
1516 (Badolato et al., 1997). Our findings suggest that IL-15, since it is a proinflammatory cytokine, may be pronounced
1517 in tissue injuries and in the fluids of chronic inflammatory diseases, justifying its superexpression in our studies
1518 in the groups with gingivitis and periodontitis.

1519 No statistically significant difference was found regarding the concentrations of IL-18, although the
1520 cytokine increased after the implant. The results corroborate another study which showed a gradual increase in the
1521 concentration of IL-18 in the peri-implant crevicular fluid after 3 months of functioning (Hu et al., 2019). The IL-
1522 18 increased one year after the implant was placed, since it is a proinflammatory cytokine that can induce IFN- γ ,
1523 GM-CSF, TNF- α , and IL-1 in immunocompetent cells, which can activate cell death by lymphocytes and regulate
1524 the expression of certain chemokine receptors (Nakanishi et al., 2001). As a result, we believe that the increase
1525 in IL-18 one year after the implant was placed is associated to an intensified proinflammatory activity, indicating
1526 local inflammation, which suggests peri-implantitis.

1527 Although the levels of IL-32 were lower one year after the implant, this diminution was not significant,
1528 and it is known that human recombinant IL-32 induces the production of several proinflammatory cytokines and
1529 chemokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007). This cytokine is produced mainly by T lymphocytes, NK
1530 cells (Novick et al., 2006) and by dendritic cells, when stimulated by IL-15 (Gorvel et al., 2017). Furthermore,
1531 IL-32 is secreted by several cells after the stimulation of certain inflammatory cytokines, such as IL-12, IL-1b,
1532 IFN- γ , IL-18 (Goda et al., 2006). IL-32 acts on macrophages/monocytes, stimulating the synthesis of TNF- α and
1533 IL-6, inducing the secretion of chemokines (IL-8, MIP-2). As mentioned above, although the IL-32 induces the
1534 production of several proinflammatory cytokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007) and is important in the
1535 triggering and persistence of the inflammatory process (Kim et al., 2005), although in our study suggests that the
1536 suppression of IL-32 interfered with the results. In addition, no studies were found in literature that related IL-32
1537 to peri-implantitis.

1538 Considering this, it is essential to trace an immune response profile that compares periodontal diseases
1539 and peri-implantitis, since it is known that patients with periodontal diseases are more likely to develop peri-
1540 implant diseases (Sgolastra et al., 2013).

1541 This study had limitations, once we obtained a reduced number of samples, as it was not possible to
1542 collect samples from all patients one year after implants installation. This study evaluated the local immune
1543 responses of gingivitis, peri-implantitis, and periodontitis in two moments: before and after the implant was placed.
1544 As a result, there was a prospective evaluation one year after the placement of the implant.

1545

1546 **5. Conclusion**

1547

1548 According to the results and methodology of this study, there was no difference in the synthesis of IL-12,
1549 IL-15, IL-18, and IL-32 in healthy individuals or in those with periodontal injuries. However, there was an increase
1550 in the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 one year after the implant was placed, which would be increasing the
1551 inflammatory activity in peri-implantitis. Since this was the first study to correlate the cytokines IL-12, IL-15, IL-

1552 18, and IL-32 before placement of an implant and one year after it, in the volunteers of a control group and in
 1553 those with injuries (gingivitis and/or periodontitis), more studies would be necessary to better understand the
 1554 immunological balance in gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis.

1555 In summation, local factors, functional implants, and the time since the installation of the implant must
 1556 be considered for future studies, so that base cytokine levels in in the peri-implant crevicular fluid can be verified.

1557 **Declaration of human rights**

1559 All procedures carried out in studies involving human beings were in accordance with the ethical
 1560 standards of the institutional and/or national research committees and with the 1964 Declaration of Helsinki and
 1561 with its later amendments or with comparable ethical standards.

1562 **Acknowledgments**

1563 We would like to thank the professors and students from the Universidade de Uberaba who gave us
 1564 support. To the coordinator of the Post-graduation Implantology Course, Alan Garcia Essado and to the
 1565 Coordinator of the Dentistry course, and Luís Henrique Borges, professors at the Universidade de Uberaba
 1566 (UNIUBE) for providing their authorization and help in the collection of samples from the Getúlio Vargas
 1567 Polyclinic, in the Universidade de Uberaba (UNIUBE). We also thank Dr. Marcos Vinícius da Silva and Dr. Ana
 1568 Carolina de Moraes Oliveira, for collaborating by performing the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA),
 1569 carried out in the immunology laboratory at the Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). This work
 1570 was financed by the Post-graduation Program in Health Sciences from the Universidade Federal do Triângulo
 1571 Mineiro (UFTM), by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); by the Post-
 1572 graduation Program in Dentistry and the Scientific Initiation Program from the Universidade de Uberaba (PIBIC-
 1573 UNIUBE- 2019/004); by the Cefores/Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); by the Conselho
 1574 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PQ-2018/Process No. 302867/2018-0), and by the
 1575 Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). The funding sources were not involved in the
 1576 design of the study, data collection, analysis, writing, nor in the decision to submit the paper for publication.

1578 **Declarations of interest**

1579 The authors declare no conflicts of interest.

1581 **References**

- 1582
 1583 Ali, M., Yang, F., Plachokova, A. S., Jansen, J. A., & Walboomers, X. F. (2021). Application of specialized pro-resolving mediators in
 1584 periodontitis and peri-implantitis: a review. *European Journal of Oral Sciences*, 129(1). doi:10.1111/eos.12759
 1585
 1586 Badolato, R; Ponzi, A.N.; Millesimo, M., Notarangelo, L.D., & Musso, T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic
 1587 protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997;90(7):2804-2809. doi: https://0019-9567/98/\$04.0010
 1588
 1589 Bannwart, C. F., Nakaira, E. T., Sartori, A., & Peraçoli, M. T. S. (2007). Interleukin-15: its role in microbial infections. *Journal of Venomous*
 1590 *Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(3). doi:10.1590/s1678-91992007000300002
 1591

- 1592 Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., & Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and
 1593 conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and
 1594 Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S286–S291. doi:10.1111/jcpe.12957
- 1595
 1596 Buduneli, E., Genel, F., Atilla, G., & Kütükçüçler, N. (2003). Evaluation of p53, bcl-2, and Interleukin-15 Levels in Gingival Crevicular Fluid
 1597 of Cyclosporin A-Treated Patients. *Journal of Periodontology*, 74(4), 506–511. doi:10.1902/jop.2003.74.4.506
- 1598
 1599 Carson, W., & Caligiuri, M. A. (1998). Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Brazilian Journal of Medical
 1600 and Biological Research*, 31(1), 1–9. doi:10.1590/s0100-879x1998000100001
- 1601
 1602 Carson, W.E., Ross, M.E., Baiocchi, R.A., Marien, M.J., Boiani, N., Grabstein, K; Caligiuri, M.A. (1995). Endogenous production of
 1603 interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *The Journal
 1604 of Clinical Investigation*. 96, 2578-82. doi: 10.1172/JCI118321
- 1605
 1606 Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., & Yoshie, H. (2018). Periodontal health and
 1607 gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on
 1608 the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S68–S77.
 1609 doi:10.1111/jcpe.12940
- 1610
 1611 Conti, P., Youinou, P., & Theoharides, T. C. (2007). Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32).
 1612 *Autoimmunity Reviews*, 6(3), 131–137. doi:10.1016/j.autrev.2006.08.015
- 1613
 1614 De Araújo, M. F., Etchebehere, R. M., de Melo, M. L. R., Beghini, M., Severino, V. O., de Castro Côbo, E., & de Lima Pereira, S. A.
 1615 (2017). Analysis of CD15, CD57 and HIF-1 α in biopsies of patients with peri-implantitis. *Pathology - Research and Practice*, 213(9), 1097–
 1616 1101. doi: 10.1016/j.prp.2017.07.020
- 1617
 1618 De Mendonça, A. C., Santos, V. R., César-Neto, J. B., & Duarte, P. M. (2009). Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels After Surgical Anti-
 1619 Infective Mechanical Therapy for Peri-Implantitis: A 12-Month Follow-Up. *Journal of Periodontology*, 80(4), 693–
 1620 699. doi:10.1902/jop.2009.080521
- 1621
 1622 Escobar, G.F., Abdalla, D.R., Beghini, M., Gotti, V.B., Junior, V.R., Napimoga, M.H.; Ribeiro, B.M., Rodrigues, D.B.R., Nogueira, R.D., &
 1623 de Lima Pereira, S.A. (2018). Levels of Pro and Anti-inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein in Patients with Chronic Periodontitis
 1624 Submitted to Nonsurgical Periodontal Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(7), 1927-1933.
 1625 doi:10.22034/APJCP.2018.19.7.1927
- 1626
 1627 Figueredo, C. M., Rescala, B., Teles, R. P., Teles, F. P., Fischer, R. G., Haffajee, A. D., & Gustafsson, A. (2008). Increased interleukin-18 in
 1628 gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 173–176. doi:10.1111/j.1399-
 1629 302x.2007.00408.x
- 1630
 1631 Goda, C., Kanaji, T., Kanaji, S., Tanaka, G., Arima, K., Ohno, S., & Izuhara, K. (2006). Involvement of IL-32 in activation-induced cell death
 1632 in T cells. *International Immunology*, 18(2), 233–240. doi:10.1093/intimm/dxh339
- 1633
 1634 Gorvel, L., Korenfeld, D., Tung, T., & Klechevsky, E. (2017). Dendritic Cell–Derived IL-32 α : A Novel Inhibitory Cytokine of NK Cell
 1635 Function. *The Journal of Immunology*, 199(4), 1290–1300. doi:10.4049/jimmunol.1601477
- 1636
 1637 Green, M.R., & Sambrook, J. (2018). A Single-Step Method for the Simultaneous Preparation of DNA, RNA, and Protein from Cells and
 1638 Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(1), pdb.prot093500. doi:10.1101/pdb.prot093500
- 1639
 1640 Hu, Z., Wu, D., Zhao, Y., Chen, S., & Li, Y. (2019). Inflammatory cytokine profiles in the crevicular fluid around clinical healthy dental
 1641 implants compared to the healthy contralateral side during the pilot stages of implant function. *Archives of Oral Biology*,
 1642 104509. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.10
- 1643
 1644 Johnson, R. B., & Serio, F. G. (2005). Interleukin-18 Concentrations and the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*,
 1645 76(5), 785–790. doi:10.1902/jop.2005.76.5.785
- 1646
 1647 Kalsi A., Moreno, F., & Petridis, H. (2021). Biomarkers associated with periodontitis and peri-implantitis: a systematic review. *Journal of
 1648 Periodontal & Implant Science*, 51(1): 3–17. doi: 10.5051/jpis.1902840142
- 1649
 1650 Kim, S.-H., Han, S.-Y., Azam, T., Yoon, D.-Y., & Dinarello, C. A. (2005). Interleukin-32. *Immunity*, 22(1), 131–
 1651 142. doi:10.1016/j.immuni.2004.12.003
- 1652
 1653 Kormas, I., Pedercini, C., Pedercini, A., Raptopoulos, M., Alassy, H., & Wolff, L.F. (2020). Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical,
 1654 Histological, Microbiological Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. *Antibiotics*. 9(11), 835.
 1655 doi:10.3390/antibiotics9110835
- 1656
 1657 Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., & Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of
 1658 Immunology*, 19(1), 423–474. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.
- 1659

- 1660 Novick, D., Rubinstein, M., Azam, T., Rabinkov, A., Dinarello, C. A., & Kim, S.-H. (2006). Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3316–3321. doi:10.1073/pnas.0511206103
- 1661
- 1662
- 1663 Orozco, A., Gemmell, E., Bickel, M., & Seymour, G. J. (2006). Interleukin-1 beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid
- 1664 and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4), 256–260. doi:10.1111/j.1399-
- 1665 302x.2006.00292.x
- 1666
- 1667 Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., & Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of
- 1668 workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical*
- 1669 *Periodontology*, 45, S162–S170. doi:10.1111/jcpe.12946
- 1670
- 1671 Pradeep, A. R., Daisy, H., Hadge, P., Garg, G., & Thorat, M. (2009). Correlation of Gingival Crevicular Fluid Interleukin-18 and Monocyte
- 1672 Chemoattractant Protein-1 Levels in Periodontal Health and Disease. *Journal of Periodontology*, 80(9), 1454–
- 1673 1461. doi:10.1902/jop.2009.090117
- 1674
- 1675 Renvert, S., Persson, G. R., Piri, F. Q., & Camargo, P. M. (2018). Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case
- 1676 definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S278–S285. doi:10.1111/jcpe.12956
- 1677
- 1678 Rinke, S., Nordlohne, M., Leha, A., Renvert, S., Schmalz, G., & Ziebolz, D. (2020). Risk indicators for mucositis and peri-implantitis: results
- 1679 from a practice-based cross-sectional study. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 50(3), 183–196. doi: 10.5051/jpis.2020.50.3.183
- 1680
- 1681 Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M. M., Wagner, J. A., Jewell, B. A., Schappe, T., & Fehniger, T. A. (2016). Cytokine-induced
- 1682 memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*, 8(357), 357ra123–
- 1683 357ra123. doi:10.1126/scitranslmed. aaf2341
- 1684
- 1685 Sattler, A., Dang-Heine, C., Reinke, P., & Babel, N. (2015). IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling
- 1686 human MAIT-cell effector functions. *European Journal of Immunology*, 45(8), 2286–2298. doi:10.1002/eji.201445313
- 1687
- 1688 Schierano, G., Pejrone, G., Brusco, P., Trombetta, A., Martinasso, G., Preti, G., & Canuto, R. A. (2008). TNF- α TGF- β 2 and IL-1 β levels in
- 1689 gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(6), 532–
- 1690 538. doi:10.1111/j.1600-051x.2008.01224.x
- 1691
- 1692 Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Gatto, R., & Monaco, A. (2013). Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis.
- 1693 *Clinical Oral Implants Research*, 26(4), e8–e16. doi:10.1111/clr.12319
- 1694
- 1695 Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal
- 1696 diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–355. doi:10.1590/1678-775720140259
- 1697
- 1698 Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification
- 1699 and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S149–S161. doi:10.1111/jcpe.12945
- 1700
- 1701 Ussher, J. E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., & Willberg, C. B. (2013). CD161++CD8+T cells, including
- 1702 the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *European Journal of Immunology*, 44(1), 195–
- 1703 203. doi:10.1002/eji.201343509
- 1704
- 1705 Yoshikai, Y., & Nishimura, H. (2000). The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes and*
- 1706 *Infection*, 2(4), 381–389. doi:10.1016/s1286-4579(00)00329-4
- 1707
- 1708 Zhang, X., Wang, Q., Yan, X., Shan, Y., Xing, L., Li, M., & Lai, W. (2020). Immune landscape of periodontitis unveils alterations of infiltrating
- 1709 immunocytes and molecular networks-aggregating into an interactive web-tool for periodontitis related immune analysis and visualization.
- 1710 *Journal of Translational Medicine*, 18(1). doi:10.1186/s12967-020-02616-1
- 1711
- 1712 Zhuang, L., Fulton, R. J., Rettman, P., Sayan, A. E., Coad, J., Al-Shamkhani, A., & Khakoo, S. I. (2018). Activity of IL-12/15/18 primed
- 1713 natural killer cells against hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 13, 75–83. doi:10.1007/s12072-018-9909-3
- 1714
- 1715
- 1716
- 1717
- 1718
- 1719
- 1720
- 1721

1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746

1747
1748
1749
1750
1751

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1752 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1753

1754

1755

1756

1757

1758

1759

1760

1761

1762

1763

1764

1765

1766

1767

1768

1769

1770

1771

1772

1773

1774

1775

1776

1777

1778

1779

1780

1781

1782

1783

As doenças periodontais, incluindo gengivite e periodontite, são as doenças crônicas mais comuns em infecções em adultos que se caracterizam por uma progressão a danos ao tecido de suporte dentário, além de serem causadas por um agente patogênico da microbiota do biofilme subgengival.

Já as doenças peri-implantares (mucosite peri-implantar e peri-implantite) são aquelas associadas ao biofilme, e a progressão da peri-implantite parece ser mais rápida que a da periodontite. Recomenda-se que os clínicos obtenham radiografias e medidas de sondagem imediatamente após a finalização da prótese sobre implante. Uma radiografia adicional depois do período de carga deve ser obtida para se estabelecer uma referência de nível ósseo após a remodelação fisiológica. Devem ser obtidos radiografias e dados clínicos prévios, caso seja um paciente novo na implantodontia, para avaliar as mudanças no nível ósseo.

Os implantes dentários são uma opção de tratamento com resultados confiáveis na reabilitação oral, indicada para reabilitar espaços decorrentes de ausências dentais parciais ou totais, a fim de garantir vários tipos de próteses. Os implantes dentários são utilizados para a substituição de um dente em zonas estéticas.

O estudo realizado apresentou limitações importantes, pois não foi possível coletar amostras de todos os pacientes após um ano da instalação dos implantes. O presente estudo avaliou as respostas imune local das condições gengivite, periodontite e peri-implantite em dois momentos: antes e após a instalação do implante. Havendo, assim, neste estudo, uma avaliação prospectiva de um ano após a instalação do implante, a condição de peri-implantite no momento da coleta do fluido crevicular peri-implantar (FCPI).

No início deste presente estudo tivemos como objetivo comparar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival (FCG) e peri-implantar (FCPI) de pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite antes e um ano após a instalação do implante, através da técnica de ELISA e com os resultados do presente estudo conseguimos alcançar esses objetivos. Dessa forma, após concluído o trabalho as expectativas foram alcançadas, já que conseguimos, através de análise estatística, obter resultados comparativos de uma variedade de marcadores inflamatórios pela análise do fluido crevicular gengival (FCG) e do fluido crevicular peri-implantar (FCP).

1784 Verificou-se que não houve diferença na síntese de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 entre
1785 indivíduos saudáveis e indivíduos com lesão periodontal, sugerindo que a IL-32 possa ter
1786 contribuído para a não ativação de IL-12, IL-15 e IL-18, inibindo os níveis destas citocinas no
1787 fluido crevicular gengival (FCG) e no fluido crevicular peri-implantar (FCPI). Todavia,
1788 evidencia-se que houve um aumento das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 um ano após a
1789 instalação do implante, o que estaria intensificando a atividade pró-inflamatória na peri-
1790 implantite.

1791 Sabe-se que pacientes com doenças periodontais apresentam maior probabilidade de
1792 desenvolver peri-implantite. Assim, é de grande importância traçar um perfil de resposta
1793 imunológica que compare essas doenças em um único paciente, com a finalidade de prevenir
1794 insucessos na evolução da osseointegração dos implantes dentários. Diante disso, tal
1795 contribuição científica, aliada a outros estudos anteriores, torna-se uma ferramenta fundamental
1796 para entender melhor a inflamação da gengivite, periodontite e peri-implantite, servindo de base
1797 para ampliar o campo científico, possibilitando, como consequência benéfica, uma maneira de
1798 tentar reverter o quadro inflamatório.

1799 Sendo assim, como este estudo foi o primeiro a correlacionar as citocinas IL-12, IL-15,
1800 IL-18 e IL-32 antes e um ano após a instalação do implante entre os voluntários controle que
1801 possuíam gengivite, periodontite e peri-implantite, são necessários mais estudos para melhor
1802 compreender o equilíbrio imunológico nestas três doenças.

1803

1804

1805

1806

1807

1808

1809

1810

1811

1812

1813

1814

1815

1816

1817

1818

1819

1820

1821

1822

1823

1824

1825

1826

1827

1828

1829

1830

1831

1832

1833

CONCLUSÃO

1834 7. CONCLUSÃO

1835

1836 De acordo com os resultados do presente estudo e a metodologia empregada, não houve
1837 diferença na síntese de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 entre indivíduos saudáveis e indivíduos com
1838 doença periodontal. Todavia, houve aumento das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 um ano após a
1839 instalação do implante, o que estaria intensificando a atividade pró-inflamatória na peri-
1840 implantite. Como este estudo foi o primeiro a correlacionar as citocinas IL-12, IL-15, IL-18 e
1841 IL-32 antes e um ano após a instalação do implante entre os voluntários controle que possuíam
1842 doença periodontal (gingivite e/ou periodontite), são necessários mais estudos para melhor
1843 compreender o equilíbrio imunológico na gingivite, na periodontite e na peri-implantite.

1844 Em suma, fatores locais, implante funcional e o tempo da instalação dos implantes
1845 devem ser considerados de grande importância em estudos futuros para verificar níveis basais
1846 de citocinas no fluido crevicular gengival e no fluido crevicular peri-implantar.

1847

1848

1849

1850

1851

1852

1853

1854

1855

1856

1857

1858

1859

1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882

REFERÊNCIAS

1883 **REFERÊNCIAS**

1884

1885 ABADIE, V., JABRI, B. IL-15: a central regulator of celiac disease
1886 immunopathology. **Immunological Reviews**, v. 260, p. 221–234, 2014. DOI:
1887 10.1111/imr.12191

1888

1889 AHMED, H. A., MAKLAD, A. M., KHALED, S. A., ELYAMANY, A. Interleukin-27 and
1890 interleukin-35 in de novo acute myeloid leukemia: expression and significance as biological
1891 markers. **Journal of Blood Medicine**, v. 10, p. 341–349, 2019. doi:10.2147/jbm.s221301

1892

1893 ALBANDAR, J. M., SUSIN, C., HUGHES, F. J. Manifestations of systemic diseases and
1894 conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic
1895 considerations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. S171–S189, 2018. DOI:
1896 10.1111/jcpe.12947

1897

1898 ALI, M., YANG, F., PLACHOKOVA, A. S., JANSEN, J. A., WALBOOMERS, X. F.
1899 (2021). Application of specialized pro-resolving mediators in periodontitis and peri-implantitis:
1900 a review. **European Journal of Oral Sciences**, v. 129, n. 1, 2021. doi:10.1111/eos.12759

1901 AMERICAN ACADEMY OF IMPLANT DENTISTRY. **Glossary of implant terms, 2016.**
1902 Disponível em: <http://www.brightcopy.net/allen/orim/Glossary/index.php#/0>. Acesso em
1903 27/03/2020.

1904

1905 AMSEN, D., SPILIANAKIS, C. G., FLAVELL, R. A. How are TH1 and TH2 effector cells
1906 made? **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 2, p. 153–160,
1907 2009. doi:10.1016/j.coi.2009.03.010

1908

1909 ANDREASI BASSI, M.; LOPEZ, M.A.; CONFALONE, L.; GAUDIO, R.M.; LOMBARDO,
1910 L.; LAURITANO, D. Clinical outcome of a two-piece implant system with an internal
1911 hexagonal connection: a prospective study. **Journal of Biological Regulators and**
1912 **Homeostatic Agents Archivi**, v. 30, p. 7-12, 2016.

1913

1914 ARAUJO, M.G., LINDHE, J. Peri-implant health. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45,
1915 n. Suppl 20, p. S36–S36, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12952

1916

1917 ATA-ALI, J., FLICHY-FERNÁNDEZ, A. J., ALEGRE-DOMINGO, T., ATA-ALI, F.,
1918 PALACIO, J., PEÑARROCHA-DIAGO, M. Clinical, microbiological, and immunological
1919 aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a
1920 prospective cross-sectional study. **BMC Oral Health**, v. 15, n. 43, 2015. doi:10.1186/s12903-
1921 015-0031-9

1922

1923 BAI, X., SHANG, S., HENAO-TAMAYO, M., BASARABA, R.J., OVRUTSKY, A.R.,
1924 MATSUDA, J.L., et al. A expressão de IL-32 humana protege os camundongos contra uma
1925 cepa hipervirulenta de Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of**
1926 **Sciences USA**, v.112, n.16, p.5111–5116, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424302112>

1927

- 1928 BALEJO, R.D.P., CORTELLI, J.R., COSTA, F.O., CYRINO, R.M., AQUINO, D.R., COGO-
 1929 MÜLLER, K., CORTELLI, S.C. Effects of chlorhexidine preprocedural rinse on bacteremia in
 1930 periodontal patients: a randomized clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, p.
 1931 586–595, 2017. DOI: 10.1590 / 1678-7757-2017-0112
- 1932 BAMFORD, R. N., GRANT, A. J., BURTON, J. D., PETERS, C., KURYS, G., GOLDMAN,
 1933 C. K., WALDMANN, T. A. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a
 1934 cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction
 1935 of lymphokine-activated killer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.
 1936 91, n. 11, p. 4940–4944, 1994. doi:10.1073/pnas.91.11.4940
 1937
- 1938 BERGAMASCHI, C., et al. Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-
 1939 15R α in human and mouse serum. **Blood**, v.120, e1–e8, 2012. DOI: 10.1182/blood-2011-10-
 1940 384362
 1941
- 1942 BERGLUNDH, T., ARMITAGE, G., ARAUJO, M. G., AVILA-ORTIZ, G., BLANCO, J.,
 1943 CAMARGO, P. M., ZITZMANN, N. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report
 1944 of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-
 1945 Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, S286–S291,
 1946 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>
- 1947 BESCHNIDT, S.M.; CACACI, C.; DEDEOGLU, K.; HILDEBRAND, D.; HULLA, H.;
 1948 IGLHAUT, G.; KRENNMAIR, G.; SCHLEE, M.; SIPOS, P.; STRICKER, A.; et al. Implant
 1949 success and survival rates in daily dental practice: 5-year results of a non-interventional study
 1950 using CAMLOG SCREW-LINE implants with or without platform-switching abutments.
 1951 **International Journal of Implant Dentistry**, v. 4, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s40729-018-
 1952 0145-3
- 1953 BHAT, S., GARDI, N., HAKE, S., KOTIAN, N., SAWANT, S., KANNAN, S.; JOSHI, N.
 1954 N. Impact of intra-tumoral IL17A and IL32 gene expression on T-cell responses and lymph
 1955 node status in breast cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.
 1956 143, n. 9, p.1745–1756, 2017. doi:10.1007/s00432-017-2431-5
 1957
- 1958 BOUCHAUD, G., et al. Epidermal IL-15R α acts as an endogenous antagonist of psoriasiform
 1959 inflammation in mouse and man. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 2105–2117,
 1960 2013. DOI: 10.1084/jem.20130291
 1961
- 1962 BOUKORTT, K. N., SAIDI-OUAHRANI, N., BOUKERZAZA, B., OUHAIBI-DJELLOULI,
 1963 H., HACHMAOUI, K., BENAÏSSA, F. Z., ... BOUDJEMA, A. (2015). Association analysis
 1964 of the IL-1 gene cluster polymorphisms with aggressive and chronic periodontitis in the
 1965 Algerian population. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 10, p. 1463–
 1966 1470. DOI:10.1016/j.archoralbio.2015.06.018
 1967
- 1968 BOYCE, B. F., XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and
 1969 remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.
 1970 DOI:10.1016/j.abb.2008.03.018
 1971

- 1972 BRANEMARK, P. I. Osseointegration and its experimental background. **Journal of Prosthetic**
 1973 **Dentistry** [S.I.], v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983. DOI: 10.1016/s0022-3913(83)80101-2
 1974
- 1975 BURTON, J. D., BAMFORD, R. N., PETERS, C., GRANT, A. J., KURYS, G., GOLDMAN,
 1976 C. K., WALDMANN, T. A. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and
 1977 produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the
 1978 induction of lymphokine-activated killer cells. **Proceedings of the National Academy of**
 1979 **Sciences**, v. 91, n.11, p. 4935–4939, 1994. doi:10.1073/pnas.91.11.4935
 1980
- 1981 BUSENLECHNER, D., FÜRHAUSER, R., HAAS, R., WATZEK, G., MAILATH, G., &
 1982 POMMER, B. Long-term implant success at the Academy for Oral Implantology: 8-year
 1983 follow-up and risk factor analysis. **Journal of Periodontal & Implant Science** [S.I.], v. 44, n.
 1984 3, p. 102-8, 2014. doi:10.5051/jpis.2014.44.3.102
 1985
- 1986 CACACI, C.; ACKERMANN, K.L.; BARTH, T.; KISTLER, S.; STILLER, M.; SCHLEE, M.
 1987 A non-interventional multicenter study to document the implants success and survival rates in
 1988 daily dental practices of the CONELOG screw-line implant. **Clinical Oral Investigations**, v.
 1989 23, p. 2609–2616, 2019. doi:10.1007/s00784-018-2646-0
 1990
- 1991 CAMINSCHI, I., VENETSANAKOS, E., LEONG, C. C., GARLEPP, M. J., ROBINSON, B.
 1992 W. S., SCOTT, B. Cytokine Gene Therapy of Mesothelioma. **American Journal of**
 1993 **Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 347–356,
 1994 1999. doi:10.1165/ajrcmb.21.3.3575
 1995
- 1996 CANDEL-MARTI, M., FLICHY-FERNANDEZ, A., ALEGRE-DOMINGO, T., ATA-ALI, J.,
 1997 & PENARROCHA-DIAGO, M. (2011). Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant
 1998 disease. An update. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 16, n. 4, p. e518-
 1999 21. doi:10.4317/medoral.16.e518
 2000
- 2001 CARASOL, M., LLODRA, J.C., FERNÁNDEZ-MESEGUER, A., BRAVO, M., GARCÍA-
 2002 MARGALLO, M.T., CALVO-BONACHO, E., SANZ, M., HERRERA, D. Periodontal
 2003 conditions among employed adults in Spain. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, p.
 2004 548–556, 2016. doi: 10.1111 / jcpe.12558.
 2005
- 2006 CATON, J., ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T., et al. A new classification scheme for
 2007 periodontal and peri- implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the
 2008 1999 classification. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, Suppl 20, S1–S8, 2018. DOI:
 2009 10.1111/jcpe.12935
 2010
- 2011 CAVALLA, F., ARAUJO-PIRES, A.C., BIGUETTI, C.C., REDES GARLET, G.P. Cytokine
 2012 Networks Regulating Inflammation and Immune Defense in the Oral Cavity. **Current Oral**
 2013 **Health Reports**, v.1, p. 104-113, 2014. doi: 10.1007 / s40496-014-0016-9.
 2014
- 2015 CEKICI, A., KANTARCI, A., HASTURK, H., VAN DYKE, T. E. Inflammatory and immune
 2016 pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57–
 2017 80, 2014. doi:10.1111/prd.12002

- 2018
 2019 CHOI, J.-D., BAE, S.-Y., HONG, J.-W., AZAM, T., DINARELLO, C. A., HER, E., KIM, S.-
 2020 H. Identification of the most active interleukin-32 isoform. **Immunology**, v. 126, n. 4, p.535–
 2021 542, 2009. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02917.x
 2022
 2023 CHRCANOVIC, B.R., ALBREKTSSON, T., WENNERBERG, A. Reasons for failures of oral
 2024 implants. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 41, n. 6, p. 443–476,
 2025 2014. doi:10.1111/joor.12157
 2026
 2027 CIONCA, N., MULLER, N. & MOMBELLI, A. Twopiece zirconia implants supporting all-
 2028 ceramic crowns: a prospective clinical study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, p. 413–
 2029 418, 2015.
 2030
 2031 COELHO, P. G., JIMBO, R., TOVAR, N., & BONFANTE, E. A. Osseointegration:
 2032 Hierarchical designing encompassing the micrometer, micrometer, and nanometer length
 2033 scales. **Dental Materials**, v. 31, n. 1, p. 37–52, 2015. doi:10.1016/j.dental.2014.10.007
 2034
 2035 COLPITTS, S.L., et al. Cutting edge: the role of IFN- α receptor and MyD88 signaling in
 2036 induction of IL-15 expression *in vivo*. **The Journal of Immunology**, v.188, p. 2483–2487,
 2037 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1103609
 2038
 2039 CONTI, P., YOUINOU, P., & THEOHARIDES, T. C. Modulation of autoimmunity by the
 2040 latest interleukins (with special emphasis on IL-32). **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 3, p.
 2041 131–137, 2007. doi:10.1016/j.autrev.2006.08.015
 2042
 2043 DE ARAÚJO, M. F. et al. Analysis of CD15, CD57 and HIF-1 α in biopsies of patients with
 2044 peri-implantitis. **Pathology Research and Practice**, v. 213, p. 1097-1101, 2017. DOI:
 2045 10.1016/j.prp.2017.07.020
 2046
 2047 DE JONG, T., BAKKER, A.D., EVERTS, V., SMIT, T.H. The intricate anatomy of the
 2048 periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. **Journal of**
 2049 **Periodontal Research**, v.52, p. 965-974, 2017. DOI: 10.1111/jre.12477
 2050
 2051 DE OLIVEIRA, M.C, CORRÊA, D.F.M, LAURÊDO, L.F.B, MENDONÇA, L.P.F, LEMOS,
 2052 A.B, CARMO, G.G.W. Peri-implantite: etiologia e tratamento. **Revista Brasileira de**
 2053 **Odontologia**, v. 72, n. 1, p. 96-99, 2015.
 2054 DE OLIVEIRA, D.P.; OTTRIA, L.; GARGARI, M.; CANDOTTO, V.; SILVESTRE, F.J.;
 2055 LAURITANO, D. Surface modification of titanium alloys for biomedical application: From
 2056 macro to nano scale. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents Archivi**, v.
 2057 31, Suppl. 1, p. 221–232, 2017.
 2058
 2059 DE OLIVEIRA, M.C.; CORRÊA, D.F.M.; LAURÊDO, L.F.B; MENDONÇA, L.P.F;
 2060 LEMOS, A.B.; CARMO, G.G.W. Peri-implantite: etiologia e tratamento. **Revista Brasileira**
 2061 **de Odontologia**, v.72, n. 1, p. 96-99, 2015.
 2062

- 2063 DEPPE, H., WOLFF, C., BAUER, F., RUTHENBERG, R., SCULEAN, A., MÜCKE, T.
 2064 Dental implant surfaces after insertion in bone: an in vitro study in four commercial implant
 2065 systems. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, p. 1593-1600, 2018. doi: 10.1007 / s00784-
 2066 017-2262-4.
- 2067
 2068 DIÓGENES, M.A.R; CRISPIM, S.H.H; DE LIMA, N.N.M; MONTEIRO, L.K.B. Mucosite
 2069 periimplantar e periimplantite: Etiologia, fatores de risco e tratamento. **Anais da Jornada**
 2070 **Odontológica dos Acadêmicos da Católica**, v. 4, n. 1, 2018.
- 2071
 2072 DONATH, K. et al. Manual de Implantodontia. **Clínica**. Artmed, capítulo 3, 2003.
- 2073
 2074 EKE, P. I., DYE, B. A., WEI, L., SLADE, G. D., THORNTON-EVANS, G. O.,
 2075 BORGNAKKE, W. S. GENCO, R. J. Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the
 2076 United States: NHANES 2009 to 2012. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 5, p. 611–622,
 2077 2015. doi:10.1902/jop.2015.140520
- 2078
 2079 EMECEN-HUJA, P., EUBANK, T. D., SHAPIRO, V., YILDIZ, V., TATAKIS, D. N., &
 2080 LEBLEBICIOGLU, B. Peri-implant versus periodontal wound healing. **Journal of Clinical**
 2081 **Periodontology**, v.40, n. 8, p. 816–82, 2013. doi:10.1111/jcpe.12127
- 2082
 2083 EPHROS H.; KIM, S.; DeFalco, R. Periimplantitis: Evaluation and management. **Dental**
 2084 **Clinics of North America**, 2019. DOI: 10.1016/j.cden.2019.11.002
- 2085
 2086 ESCOBAR, G.F. et al. Levels of Pro and Anti-inflammatory Citokynes and C-Reactive Protein
 2087 in Patients with Chronic Periodontitis Submitted to Nonsurgical Periodontal Treatment. **Asian**
 2088 **Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, p. 1927-1933, 2018. DOI:
 2089 10.22034/APJCP.2018.19.7.1927
- 2090
 2091 ESKAN, M. A., JOTWANI, R., ABE, T., CHMELAR, J., LIM, J.-H., LIANG, S.,
 2092 HAJISHENGALLIS, G. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated
 2093 inflammatory bone loss. **Nature Immunology**, v. 13, n.5, p. 465–473,
 2094 2012. doi:10.1038/ni.2260
- 2095
 2096 ESPOSITO, M., GRUSOVIN, M. G., & WORTHINGTON, H. V. (2012). Interventions for
 2097 replacing missing teeth: treatment of peri-implantitis. **Cochrane Database of Systematic**
 2098 **Reviews**, v.2, 2008. doi:10.1002/14651858.cd004970.pub
- 2099
 2100 FAOT, F., NASCIMENTO, G. G., BIELEMANN, A. M., CAMPÃO, T. D., LEITE, F. R. M.,
 2101 QUIRYNEN, M. Can peri-implant crevicular fluid assist in the diagnosis of peri-implantitis?
 2102 A systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontology** [S.I.], v. 86, n. 5, p. 631-
 2103 45, 2015. DOI: 10.1902/jop.2015.140603
- 2104
 2105 FERES, M.; TELES, F.; TELES, R.; FIGUEIREDO, L.C.; FAVERI, M. The subgingival
 2106 periodontal microbiota of the aging mouth. **Periodontology 2000**, v. 72, n. 1, p. 30–53, 2016.
 2107 doi:10.1111/prd.12136
- 2108

- 2109 FERNANDES. M. H., GOMES, P. S. Bone Cells Dynamics during Peri-Implantitis: a
 2110 Theoretical Analysis. **Journal of Oral & Maxillofacial Research**, v. 7, n. 3, p. e6, 2016. DOI:
 2111 10.5037/jomr.2016.7306
 2112
- 2113 FIGUEREDO, C. M., RESCALA, B., TELES, R. P., TELES, F. P., FISCHER, R. G.,
 2114 HAFFAJEE, A. D., GUSTAFSSON, A. Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid
 2115 from periodontitis patients. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 2, p. 173–176,
 2116 2008. doi:10.1111/j.1399-302x.2007.00408.x
 2117
- 2118 FORD, P.J., GAMONAL, J., SEYMOUR, G.J. Immunological differences and similarities
 2119 between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontology** **2000**, v. 53,
 2120 p.111–123, 2010.. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2010.00349.x
 2121
- 2122 GAO, X., ZHOU, J., SUN, Y., WANG, L., ZHOU, Y. Differential expressions of biomarkers
 2123 in gingival crevicular fluid of Han and Uygur populations with peri-implantitis. **Medicine**, v.
 2124 97, n. 16, p. e0471, 2018. doi:10.1097/md.00000000000010471
 2125 GATELY, M. K., WOLITZKY, A. G., QUINN, P. M., & CHIZZONITE, R. Regulation of
 2126 human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. **Cellular Immunology**, v. 143, n. 1,
 2127 p. 127–142, 1992. doi:10.1016/0008-8749(92)90011-d
 2128
- 2129 GELDHOF, A.B.; MOSER, M.; LESPAIGNARD, L.; THIELEMANS, K.; DE, B.P.
 2130 Interleukin-12–Activated Natural Killer Cells Recognize B7 Costimulatory Molecules on
 2131 Tumor Cells and Autologous Dendritic Cells. **Blood**, v. 91, p. 196-206, 1998.
 2132 <https://doi.org/10.1182/blood.V91.1.196>
 2133
- 2134 GLIMCHER, L. H. Trawling for treasure: tales of T-bet. **Nature Immunology**, v.8, n.5, p.
 2135 448–450. doi:10.1038/ni0507-448
- 2136 GOKYU, M., KOBAYASHI, H., NANBARA, H., et al. Thrombospondin-1 production is
 2137 enhanced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in THP-1 cells. **PLoS One**, v. 9,
 2138 p.e115107, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115107>
- 2139 GÓMEZ-DE DIEGO, R., DR. MANG-DE LA ROSA, ROMERO-PÉREZ, M.-J., CUTANDO-
 2140 SORIANO, A., LÓPEZ-VALVERDE-CENTENO, A. Indications and contraindications of
 2141 dental implants in medically compromised patients: Update. **Medicina oral, patología oral y**
 2142 **cirugía bucal**, v. 19, n. 5, p. e483-e489, 2014. doi: 10.4317 / medoral.19565. 19565
 2143
- 2144 GRABSTEIN, K., EISENMAN, J., SHANEBECK, K., RAUCH, C., SRINIVASAN, S.,
 2145 FUNG, V. et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the
 2146 interleukin-2 receptor. **Science**, v. 264, n. 5161, p. 965–968, 1994.
 2147 doi:10.1126/science.8178155
 2148
- 2149 GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. **Journal of**
 2150 **Periodontology**, v. 79, n. 8s, p. 1585–1591, 2008. doi:10.1902/jop.2008.080183
 2151

- 2152 GRAZIANI, F., KARAPETSA, D., ALONSO, B., HERRERA, D. Nonsurgical and surgical
 2153 treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontology** **2000**, n. 75, v.
 2154 1, 152–188, 2017. doi:10.1111/prd.12201
 2155
- 2156 GRAZIANI, F., KARAPETSA, D., MARDAS, N., LEOW, N., DONOS, N. Surgical treatment
 2157 of the residual periodontal pocket. **Periodontology** **2000**, v. 76, p. 150-163, 2018. DOI:
 2158 10.1111/prd.12156
 2159
- 2160 GULATI, M., GOVILA, V., VERMA, S., RAJKUMAR, B., ANAND, V., AGGARWAL, A.,
 2161 JAIN N. In Vivo Evaluation of Two-Piece Implants Placed Following One-Stage and Two-
 2162 Stage Surgical Protocol in Posterior Mandibular Region. Assessment of Alterations in Crestal
 2163 Bone Level. **Clinical implant dentistry and related Research**, v. 17, p. 854-861, 2015. doi:
 2164 10.1111 / cid.12186.
 2165
- 2166 GUPTA, N., GUPTA, N. D., GUPTA, A., KHAN, S., BANSAL, N. Role of salivary matrix
 2167 metalloproteinase-8 (MMP-8) in chronic periodontitis diagnosis. **Frontiers of Medicine**, v.9,
 2168 n.1, p. 72-6, 2015. DOI: 10.1007/s11684-014-0347-x
 2169
- 2170 HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones,
 2171 pathobionts, and host response. **Trends Immunol**, v. 235, p. 3–11, 2014. doi: 10.1016 /
 2172 j.it.2013.09.001.
 2173
- 2174 HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic
 2175 inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 15, p. 30-44, 2015. doi: 10.1038 / nri3785.
 2176
- 2177 HAJISHENGALLIS, G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated
 2178 microbiota. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, p. 248–257, 2014. doi: 10.1111 / omi.12065.
 2179
- 2180 HAJISHENGALLIS, G., KOROSTOFF, J.M. Revisiting the Page & Schroeder model: the
 2181 good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontol**
 2182 **2000**, v.75, p. 116–151, 2017. doi: 10.1111 / prd.12181.
 2183
- 2184 HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Dancing with the Stars: How Choreographed
 2185 Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens,
 2186 Accessory Pathogens, and Pathobionts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n.6, p.477–489,
 2187 2016. doi:10.1016/j.tim.2016.02.010
- 2188 HÄMMERLE, C.H.F, TARNOW, D. The etiology of hard- and soft-tissue deficiencies at
 2189 dental implants: A narrative review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, Suppl 20, p.
 2190 S267–S277, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12955
 2191
- 2192 HAN, J. Y. A comparative study of combined periodontal and orthodontic treatment with fixed
 2193 appliances and clear aligners in patients with periodontitis. **J Periodontal Implant Sci [S.I.]**,
 2194 v. 45, n. 6, p. 193-204, 2015. doi: 10.5051/jpis.2015.45.6.193
 2195
- 2196 HEINHUIS, B., KOENDERS, M. I., VAN DEN BERG, W. B., NETEA, M. G., DINARELLO,
 2197 C. A., & JOOSTEN, L. A. B. Interleukin 32 (IL-32) Contains a Typical α -Helix Bundle

- 2198 Structure That Resembles Focal Adhesion Targeting Region of Focal Adhesion Kinase-1.
 2199 **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 8, p. 5733–5743, 2011.
 2200 doi:10.1074/jbc.m111.288290
 2201
- 2202 HEINHUIS, B., NETEA, M. G., VAN DEN BERG, W. B., DINARELLO, C. A., & JOOSTEN,
 2203 L. A. B. Interleukin-32: A predominantly intracellular proinflammatory mediator that controls
 2204 cell activation and cell death. **Cytokine**, v. 60 n. 2, p. 321–327, 2012. DOI:
 2205 http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.010
 2206
- 2207 HEINHUIS, B., PLANTINGA, T. S., SEMANGO, G., KÜSTERS, B., NETEA, M. G.,
 2208 DINARELLO, C. A., JOOSTEN, L. A. B. Alternatively spliced isoforms of IL-32 differentially
 2209 influence cell death pathways in cancer cell lines. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 2, p. 197–205,
 2210 2015. doi:10.1093/carcin/bgv172
 2211
- 2212 HEITZ-MAYFIELD, L.J.A., SALVI, G.E. Peri-implant mucositis. **Journal of Clinical**
 2213 **Periodontology**, v. 45, n. Suppl 20, p. S237–S245, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12953
 2214 HERNÁNDEZ, M., DUTZAN, N., GARCÍA-SESNICH, J., ABUSLEME, L., DEZEREGA,
 2215 A., SILVA, N, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. **Journal**
 2216 **of Dental Research**. v. 90, p. 1164–1170, 2011. DOI: 10.1177/0022034511401405
 2217
- 2218 HERNÁNDEZ-MONJARAZ B., SANTIAGO-OSORIO E., MONROY-GARCÍA A.,
 2219 LEDESMA-MARTÍNEZ E., MENDOZA-NÚÑEZ VM. Mesenchymal Stem Cells of Dental
 2220 Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. **International**
 2221 **Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 944, 2018. doi: 10.3390 / ijms19040944.
 2222
- 2223 HOLTFRETER B, ALBANDAR JM, DIETRICH T, et al. Standards for reporting chronic
 2224 periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: proposed standards from the
 2225 Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. **Journal of Clinical**
 2226 **Periodontology**, v. 42, p. 407–412, 2015. DOI: 10.1111/jcpe.12392
 2227
- 2228 HORWOOD, N. J., ELLIOTT, J., MARTIN, T. J., & GILLESPIE, M. T. (2001). IL-12 Alone
 2229 and in Synergy with IL-18 Inhibits Osteoclast Formation In Vitro. **The Journal of**
 2230 **Immunology**, v. 166, n. 8, p. 4915–4921. doi:10.4049/jimmunol.166.8.4915
 2231
- 2232 JAVED, F.; AL-HEZAIMI, K.; SALAMEH, Z.; ALMAS, K.; ROMANOS, G. E.
 2233 Proinflammatory cytokines in the crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Cytokine**,
 2234 v. 53, n. 1, p. 8–12, 2011. 10.1016/j.cyto.2010.08.013
 2235
- 2236 JEPSEN, S. et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and
 2237 acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the
 2238 Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of**
 2239 **Periodontology**, v. 89, p. S237–S248, 2018. doi:10.1002/jper.17-0733
- 2240 JOHN, G., BECKER, J., & SCHWARZ, F. (2013). Modified Implant Surface with Slower and
 2241 Less Initial Biofilm Formation. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n.
 2242 3, p. 461–468. doi:10.1111/cid.12140

- 2243
 2244 JOHNSON, R. B.; SERIO, F. G. Interleukin-18 Concentrations and the Pathogenesis of
 2245 Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 76, n.5, p.785–790, 2005.
 2246 doi:10.1902/jop.2005.76.5.78
 2247
- 2248 JOOSTEN, L. A. B., HEINHUIS, B., NETEA, M. G., & DINARELLO, C. A. Novel insights
 2249 into the biology of interleukin-32. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 20, p. 3883–
 2250 3892, 2013. doi:10.1007/s00018-013-1301-9
 2251
- 2252 KALSI A., MORENO, F., PETRIDIS, H. Biomarkers associated with periodontitis and peri-
 2253 implantitis: a systematic review. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 51, n. 1, p. 3–
 2254 17, 2021. doi: 10.5051/jpis.1902840142
 2255
 2256
- 2257 KANG, J.-W., Park, Y. S., Lee, D. H., Kim, J., Kim, M. S., Bak, Y., Yoon, D.-Y. Intracellular
 2258 Interaction of Interleukin (IL)-32 α with Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ) and STAT3 Protein
 2259 Augments IL-6 Production in THP-1 Promonocytic Cells. **Journal of Biological Chemistry**,
 2260 v. 287, n. 42, p. 35556–35564, 2012. doi:10.1074/jbc.m112.400911
 2261
- 2262 KEARNS, A. E., KHOSLA, S., & KOSTENUK, P. J. (2008). Receptor Activator of Nuclear
 2263 Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease.
 2264 **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 155–192. DOI:10.1210/er.2007-0014
 2265
 2266
- 2267 KHAWAR, B., ABBASI, M.H., SHEIKH, N. A panoramic spectrum of complex interplay
 2268 between the immune system and IL-32 during pathogenesis of various systemic infections and
 2269 inflammation. **European Journal of Medical Research**, v. 20, p.7, 2015. DOI:
 2270 10.1186/s40001-015-0083-y
 2271
- 2272 KIM, S.-H., HAN, S.-Y., AZAM, T., YOON, D.-Y., & DINARELLO, C. A. Interleukin-32.
 2273 **Immunity**, v. 22, n. 1, 131–142, 2005. doi:10.1016/j.immuni.2004.12.003
 2274
- 2275 KORMAS, I., PEDERCINI, C., PEDERCINI, A., RAPTOPOULOS, M., ALASSY, H., &
 2276 WOLFF, L.F. Peri-Implant Diseases: Diagnosis, Clinical, Histological, Microbiological
 2277 Characteristics and Treatment Strategies. A Narrative Review. **Antibiotics**. v. 9, n. 11, p. 835,
 2278 2020. doi:10.3390/antibiotics9110835
 2279
 2280
- 2281 LANG, N.P., BERGLUNDH, T. Periimplant disease: where are we now? –Consensus of the
 2282 Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38,
 2283 p. 178–181, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x
- 2284 LATHA, S., THIRUGNANAMSAMBANDAN, S., ARUN, R.T., et al. Serum ferritin level and
 2285 red blood cell parameters in healthy controls and chronic periodontitis patients. **Journal of**
 2286 **Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.7, p. 184–9, 2015. DOI: 10.4103/0975-7406.155896

- 2287 LEE, J, KIM, K.E., CHEON, S., SONG, J.H., HOUH, Y., KIM, T.S, et al. Interleukin-32 α
 2288 induces migration of human melanoma cells through downregulation of E-
 2289 cadherin. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65825-65836. DOI: 10.18632/oncotarget.11669
 2290
- 2291 LI, J. Y., & WANG, H.-L. Biomarkers Associated With Periimplant Diseases. **Implant**
 2292 **Dentistry**, v. 1, 2014. doi:10.1097/id.0000000000000129
 2293
- 2294 LING, M. R., CHAPPLE, I. L. C., MATTHEWS, J. B. Neutrophil superoxide release and
 2295 plasma C-reactive protein levels pre- and post-periodontal therapy. **Journal of Clinical**
 2296 **Periodontology**, v. 43, n. 8, p. 652–658, 2016. doi:10.1111/jcpe.12575
 2297
- 2298 LINKEVICIUS T, VAITELIS J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft
 2299 peri-implant tissues: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Implants Research**,
 2300 v. 26, n. Suppl. 11, p. 139–147, 2015. DOI: 10.1111/clr.12631
 2301
- 2302 LOPES, A.; MALO, P.; DE ARAUJO NOBRE, M.; SANCHEZ-FERNANDEZ, E. The
 2303 NobelGuideVR All-on-4VR treatment concept for the rehabilitation of edentulous jaws: a
 2304 prospective report on medium and long-term outcomes. **Clinical Implant Dentistry and**
 2305 **Related Research**, v. 17, Suppl 2, p. e406–416, 2015. DOI: 10.1111/cid.12260
 2306
- 2307 LU, K., MAHBUB, R., CABLE, P. H., RU, H., PARRY, N. M. A., BODNAR, W. M.,
 2308 TANNENBAUM, S. R. Gut Microbiome Phenotypes Driven by Host Genetics Affect Arsenic
 2309 Metabolism. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 172–174,
 2310 2014. doi:10.1021/tx400454z
 2311
- 2312 LUCACIU, O., SORIȚĂU, O., GHEBAN, D., CIUCA, D. R., VIRTIC, O., VULPOI, A.,
 2313 CRISAN, B. Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. **BMC**
 2314 **Biotechnology**, v. 15, n. 1, 2015.
 2315
- 2316 MANETTI, R. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper
 2317 type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th
 2318 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 4, p. 1199–1204,
 2319 1993. DOI:10.1084/jem.177.4.1199
 2320
- 2321 MARIN, C., GRANATO, R., SUZUKI, M., GIL, J.N., JANAL, M.N., COELHO, P.G.
 2322 Histomorphologic and histomorphometric evaluation of various endosseous implant healing
 2323 chamber configurations at early implantation times: a study in dogs. **Clinical Oral Implants**
 2324 **Research**, v. 21, n. 6, p. 577-583, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01853.x.
 2325
- 2326 MARTINS, E.O.B, MARTINS, F., ANJOS, E.D., MARQUES, D.D.M. Doenças peri-
 2327 implantares, etiologia, diagnóstico e classificação: revisão de literatura. **Brazilian Journal of**
 2328 **Periodontology**, v. 29, n.1, p.53-64, 2019.
 2329
- 2330 MARUYAMA N, MARUYAMA F, TAKEUCHI Y, AIKAWA C, IZUMI Y, NAKAGAWA
 2331 I. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. **Scientific**
 2332 **Reports**, v. 4, p. 6602, 2014.

- 2333
 2334 MASKE, B.S., RATHOD, S., WANIKAR, I. Critical issues in periodontal regeneration. **SRM**
 2335 **Journal of Research in Dental Science**, v. 9, p. 119-124, 2018. DOI:
 2336 10.4103/srmjrds.srmjrds_17_18
- 2337 MENDES, V.C; DAVIES, J.E. Uma nova perspectiva sobre a biologia da osseointegração.
 2338 **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 70, n. 2, p. 166-71, 2016.
 2339
- 2340 MISHRA, A., SULLIVAN, L., CALIGIURI, M.A. Molecular pathways: interleukin-15
 2341 signaling in health and in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, p. 2044–2050, 2014.
 2342
- 2343 MLECNIK B, et al. Functional network pipeline reveals genetic determinants associated with
 2344 in situ lymphocyte proliferation and survival of cancer patients. **Science Translational**
 2345 **Medicine**, v.6, n. 228ra37, 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007240
 2346
- 2347 MORASCHINI, V.; POUBEL, L.A.; FERREIRA, V.F.; BARBOZA EDOS, S. Evaluation of
 2348 survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up
 2349 period of at least 10 years: A systematic review. **International Journal of Oral and**
 2350 **Maxillofacial Surgery**, v. 44, p.377–388, 2015. DOI: 10.1016/j.ijom.2014.10.023
 2351
- 2352 MOUTSOPOULOS, N.M., KONKEL, J.E. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal
 2353 Barrier. **Trends in Immunology**, v. 39, p. 276–287, 2018. doi: 10.1016 / j.it.2017.08.005.
 2354 MURAKAMI, M., KAMIMURA, D., & HIRANO, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from
 2355 the Interleukin 6 Family of Cytokines. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 812–831, 2019.
 2356 doi:10.1016/j.immuni.2019.03.027
 2357
- 2358 NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates
 2359 both Th1 and Th2 responses. **Annual Review Immunology**, v. 19, p. 423-474, 2001.
 2360 doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.423.
 2361
- 2362 NASTALA CL, EDINGTON HD, MCKINNEY TG, TAHARA H, NALESNIK MA et
 2363 al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma
 2364 production. **Journal of Immunology**, v. 153, p.1697-1706, 1994. PubMed: 7913943.
 2365
- 2366 NETEA, M. G., JOOSTEN, L. A. B., LEWIS, E., JENSEN, D. R., VOSHOL, P. J.,
 2367 KULLBERG, B. J., VAN DER MEER, J. W. M. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to
 2368 hyperphagia, obesity and insulin resistance. **Nature Medicine**, v.12, n.6, p.650–656,
 2369 2006. doi:10.1038/nm1415
 2370
- 2371 NETEA, M. G., LEWIS, E. C., AZAM, T., JOOSTEN, L. A. B., JAEKAL, J., BAE, S.-Y. KIM,
 2372 S.-H. Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells.
 2373 **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 9, 3515–3520,
 2374 2008. doi:10.1073/pnas.0712381105
 2375
- 2376 NIBALI, L. Genetic Influences on the Periodontal Microbial-Host Crosstalk. In: Bostanci N.,
 2377 Belibasakis GN, editors. Pathogenesis of Periodontal Diseases: Biological Concepts for

- 2378 Clinicians. **Springer International Publication**, p. 87–95, 2018. DOI:10.1007/978-3-319-
2379 53737-5_7
- 2380
- 2381 NOTHDURFT, F. P., FONTANA, D., RUPPENTHAL, S., MAY, A., AKTAS, C.,
2382 MEHRAEIN, Y., KAESTNER, L. Differential behavior of fibroblasts and epithelial cells on
2383 structured implant abutment materials: A comparison of materials and surface
2384 topographies. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, p. 1237–1249, 2015.
2385 DOI: 10.1111/cid.12253
- 2386
- 2387 NOWZARI, H., BOTERO, J. E., DEGIACOMO, M., VILLACRES, M. C., & RICH, S.
2388 K. Microbiology and Cytokine Levels Around Healthy Dental Implants and Teeth. **Clinical**
2389 **Implant Dentistry and Related Research**, v. 10, n.3, p.166–173, 2008. doi:10.1111/j.1708-
2390 8208.2007.00076.x
- 2391
- 2392 OKAMURA, H., TSUTSUI, H., KOMATSU, T., YUTSUDO, M., HAKURA, A.,
2393 TANIMOTO, T., KURIMOTO, M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production
2394 by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88–91, 1995. doi:10.1038/378088a0
- 2395
- 2396 OTTRIA, L.; LAURITANO, D.; ANDREASIBASSI, M.; PALMIERI, A.; CANDOTTO, V.;
2397 TAGLIABUE, A.; TETTAMANTI, L. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium
2398 and titanium alloys in implant dentistry. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic**
2399 **Agents Archivi**, v. 32, Suppl. 1, p. 81–90, 2018.
- 2400 ÖZÇAKA, Ö., NALBANTSOY, A., & BUDUNELI, N. Interleukin-17 and interleukin-18
2401 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal**
2402 **Research**, v. 46, p. 592–598, 2011. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01377.x
- 2403 PALSTRA, R.-J., DE CRIGNIS, E., RÖLING, M. D., VAN STAVEREN, T., KAN, T. W.,
2404 VAN IJCKEN, W., MAHMOUDI, T. Allele-specific long-distance regulation dictates IL-32
2405 isoform switching and mediates susceptibility to HIV-1. **Science Advances**, v. 4, n. 2,
2406 p.e1701729, 2018. doi:10.1126/sciadv.1701729
- 2407
- 2408 PAN, Y. H., LIN, H. K., LIN, J. C.-Y., HSU, Y.-S., WU, Y.-F., SALAMANCA, E., & CHANG,
2409 W.-J. Evaluation of the Peri-Implant Bone Level around Platform-Switched Dental Implants:
2410 A Retrospective 3-Year Radiographic Study. **International Journal of Environmental**
2411 **Research and Public Health**, v.16, n.14, p. 2570, 2019. doi:10.3390/ijerph16142570
- 2412
- 2413 PAPAPANOU, P.N; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D.H., et
2414 al. Periodontitis: Consensus report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the
2415 Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical**
2416 **Periodontology**, v. 45, Suppl 20, S162–S170, 2018. doi:10.1111/jcpe.12946
- 2417
- 2418 PARK ES, YOO JM, YOO HS, YOON DY, YUN YP, HONG J. IL-32 γ enhances TNF- α -
2419 induced cell death in colon cancer. **Molecular carcinogenesis**, 2014, v.53, n. Suppl 1,
2420 p.E23–35. DOI: 10.1002/mc.21990
- 2421
- 2422 PARK, M. H., SONG, M. J., CHO, M.-C., MOON, D. C., YOON, D. Y., HAN, S. B., & HONG,
2423 J. T. Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation

- 2424 of death receptor 3. **Immunology**, v.135, n.1, p. 63–72, 2011. doi:10.1111/j.1365-
2425 2567.2011.03513.x
- 2426 PAVAN KUMAR, A., JAGDISHREDDY, G., RAJA BABU P. Biomarkers in periodontal
2427 disease. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 6, p.232, 2015. DOI:
2428 10.15761/DOCR.1000111
- 2429
2430 PAZ, H., TSOI, J., KALBASI, A., GRASSO, C. S., MCBRIDE, W. H., SCHAUE, D.,
2431 ECONOMOU, J. S. Interleukin 32 expression in human melanoma. **Journal of Translational**
2432 **Medicine**, v. 17, n.1, 2019. doi:10.1186/s12967-019-1862-y
- 2433
2434 PERCIVAL, S.L., SULEMAN, L., VUOTTO, C., DONELLI, G. Healthcare-associated
2435 infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. **Journal of Medical**
2436 **Microbiology**, v.64, p.323–334, 2015. doi:10.1099/jmm.0.000032.
- 2437
2438 PEROVIĆ J. **Oral implantology**. Belgrade: Tekom; 2001. (Serbian)
- 2439 PETKOVIĆ-CURCIN, A., MATIĆ, S.; VOJVODIĆ, D., STAMATOVIĆ, N.; TODOROVIĆ,
2440 T. Cytokines in pathogenesis of peri-implantitis. **Vojnosanitetski pregled**, v. 68, n. 5, p. 435-
2441 440, 2011. DOI:10.2298/VSP1105435P
- 2442
2443 PFLANZ, S., TIMANS, J. C., CHEUNG, J., ROSALES, R., KANZLER, H., GILBERT, J.,
2444 KASTELEIN, R. A. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EB13 and p28 Protein,
2445 Induces Proliferation of Naive CD4+ T. **Cellular Immunology**, v. 16, n.6, p.779–790, 2002.
2446 doi:10.1016/s1074-7613(02)00324-2
- 2447
2448 QIU, W.; WU, B.L., FANG, F.C. Overview of noncoding RNAs involved in the osteogenic
2449 differentiation of periodontal ligament stem cells. **World Journal Stem Cells**, v. 12, n. 4, p.
2450 251-265, 2020. doi: 10.4252/wjsc.v12.i4.251
- 2451
2452 REDDY, P. Interleukin-18: recent advances Current Opinion in Hematology. **Current Opinion**
2453 **in Hematology**, v. 11, n. 6, p. 405-410, 2004. DOI: 10.1097/01.moh.0000141926.95319.42
- 2454
2455 RENVERT, S., PERSSON, G.R., PIRIH, F.Q., CAMARGO, P.M. Peri-implant health, peri-
2456 implant mucositis and peri-implantitis: case definitions and diagnostic considerations. **Journal**
2457 **of Clinical Periodontology**, v. 45, (Suppl 20), p.S278–S285, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12956
- 2458
2459 RINKE, S., NORDLOHNE, M., LEHA, A., RENVERT, S., SCHMALZ, G., & ZIEBOLZ, D.
2460 Risk indicators for mucositis and peri-implantitis: results from a practice-based cross-sectional
2461 study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 50, n. 3, p. 183-196, 2020. doi:
2462 10.5051/jpis.2020.50.3.183
- 2463
2464
2465 ROBITAILLE, N., REED, D. N., WALTERS, J. D., & KUMAR, P. S. Periodontal and peri-
2466 implant diseases: identical or fraternal infections? **Molecular Oral Microbiology**, v.31, n.4,
2467 p.285–301, 2015. doi:10.1111/omi.12124
- 2468

- 2469 ROCHMAN, Y., SPOLSKI, R., LEONARD, W.J. New insights into the regulation of T cells
2470 by γ_c family cytokines. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 480–490, 2009. DOI:
2471 10.1038/nri2580
- 2472
- 2473 SALVI, G.E., BOSSHARDT, D.D., LANG, N.P., ABRAHAMSSON, I., BERGLUNDH, T.,
2474 LINDHE, J., DONOS, N. Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium
2475 dental implants. **Periodontology** **2000**, v. 68, p. 135–152, 2015. DOI: 10.1111/prd.12054
- 2476
- 2477 SALVI, P., ZAMORA-PEREZ, A., FUENTES-LERMA, M., ROBLES-GÓMEZ, C.,
2478 MARIAUD-SCHMIDT, R., & GUERRERO-VELÁZQUEZ, C. (2011). IL-12 and IL-18 levels
2479 in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. **Oral Diseases**, v. 17, n. 5,
2480 522–529, 2011. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01798.x
- 2481 SANZ, M., CERIELLO, A., BUYSSCHAERT, M., et al. Scientific evidence on the links
2482 between periodontal diseases and diabetes: consensus report and guidelines of the joint
2483 workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and
2484 the European Federation of Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v.45, p.138–
2485 149, 2018. doi: 10.1016/j.diabres.2017.12.001.
- 2486
- 2487 SARHAN, D., HIPPEN, K. L., LEMIRE, A., HYING, S., LUO, X., LENVIK, T., MILLER, J.
2488 S. Adaptive NK Cells Resist Regulatory T-cell Suppression Driven by IL37. **Cancer**
2489 **Immunology Research**, v. 6, n. 7, p. 766–775, 2018. doi:10.1158/2326-6066.cir-17-0498
- 2490
- 2491 SASAKI H, et al. Gamma Interferon (IFN- γ) and IFN- γ -Inducing Cytokines Interleukin-12 (IL-
2492 12) and IL-18 Do Not Augment Infection-Stimulated Bone Resorption In Vivo. **Clinical and**
2493 **Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p. 106-110, 2004. DOI: 10.1128/CDLI.11.1.106–
2494 110.2004
- 2495
- 2496 SCHMINKE, B., VOM ORDE, F., GRUBER, R., SCHLIEPHAKE, H., BÜRGERS, R., &
2497 MIOSGE, N. The Pathology of Bone Tissue during Peri-Implantitis. **Journal of Dental**
2498 **Research**, v. 94, n. 2, p. 354–361, 2014. doi:10.1177/0022034514559128
- 2499
- 2500 SCHWARZ F, DERKS J, MONJE A, WANG H-L. Peri-implantitis. **Journal of Clinical**
2501 **Periodontology**, v. 45, n. (Suppl 20), p. S246–S266, 2018.
- 2502
- 2503 SCULEAN, A., CHAPPLE, I. L. C., & GIANNOBILE, W. V. Wound models for periodontal
2504 and bone regeneration: the role of biologic research. **Periodontology** **2000**, v. 68, n. 1, p. 7–20,
2505 2015. doi:10.1111/prd.12091
- 2506
- 2507 SEN, S., GIAMBERARDINO, L.D., MOSS, K., MORELLI, T., ROSAMOND, W.D.,
2508 GOTTESMAN, R.F., OFFENBACHER, S. (2018). Periodontal Disease, Regular Dental Care
2509 Use, and Incident Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 49, p. 355–362, 2018. DOI:
2510 <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018990>
- 2511
- 2512 SENNA, P., ANTONINHA DEL BEL CURY, A., KATES, S., MEIRELLES, L. Surface
2513 Damage on Dental Implants with Release of Loose Particles after Insertion into Bone. **Clinical**

- 2513 **Implant Dentistry and Related Research**, v. 17, n. 4, p. 681–692,
2514 2013. doi:10.1111/cid.12167
2515
- 2516 SEVERINO, V.O.; NAPIMOGA, M.H.; DE LIMA PEREIRA, S.A. Expression of IL-6, IL-10,
2517 IL-17 and IL-33 in the peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implant mucositis and
2518 peri-implantitis. **Archives of Oral Biology** [S.I.], v. 72, p. 194-199, 2016. DOI:
2519 10.1016/j.archoralbio.2011.01.006
2520
- 2521 SHARMA, A., KHATTAK, B., NAAGTILAK, S, SINGH, G., BANO, T. Effect of Periodontal
2522 Therapy on Salivary Interleukin-12 Levels in Chronic Periodontitis. **Journal of Clinical and**
2523 **Diagnostic Research**, v. 8, p. ZC90 – ZC92, 2014. doi: 10.7860/JCDR/2014/10598.5073
2524
- 2525 SHIBATA, Y., TANIMOTO, Y. Uma revisão dos métodos aprimorados de fixação para
2526 implantes dentários - parte I: otimização da superfície para uma rápida
2527 osseointegração. **Journal of Prosthodontic Research**, v.59, n.1, p. 20–33, 2015. doi: 10.1016
2528 /j.jpor.2014.11.007.
2529
- 2530 SIDDIQUI, F., LI, C.-Y., LARUE, S. M., POULSON, J. M., AVERY, P. R., PRUITT, A. F.,
2531 HAUCK, M. L. A phase I trial of hyperthermia-induced interleukin-12 gene therapy in
2532 spontaneously arising feline soft tissue sarcomas. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 1,
2533 p. 380–389, 2007. doi:10.1158/1535-7163.mct-06-0342
2534
- 2535 SILVA, N.; ABUSLEME, L.; BRAVO, D.; DUTZAN, N.; GARCIA-SESNICH, J.; VERNAL,
2536 R.; GAMONAL, J. Host response mechanisms in periodontal diseases. **Journal of Applied**
2537 **Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015. doi:10.1590/1678-775720140259
2538
- 2539 SMEETS, R., HENNINGSEN, A., JUNG, O., HEILAND, M., HAMMÄCHER, C., & STEIN,
2540 J. M. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. **Head &**
2541 **Face Medicine**, v. 10, n. 1, 2014. doi:10.1186/1746-160x-10-34
2542
- 2543 SMEETS, R., STADLINGER, B., SCHWARZ, F., BECK-BROICHSITTER, B., JUNG, O.,
2544 PRECHT, C., EBKER, T. Impact of Dental Implant Surface Modifications on
2545 Osseointegration. **BioMed Research International**, p. 1–16, 2016. DOI:
2546 10.1155/2016/6285620
2547
- 2548 SOWMYA, S., MONY, U., JAYACHANDRAN, P., RESHMA, S., KUMAR, R. A., ARZATE,
2549 H., JAYAKUMAR, R. Tri-Layered Nanocomposite Hydrogel Scaffold for the Concurrent
2550 Regeneration of Cementum, Periodontal Ligament, and Alveolar Bone. **Advanced Healthcare**
2551 **Materials**, v.6, n.7, p.1601251, 2017. doi:10.1002/adhm.201601251
- 2552 STADLER, A. F., ANGST, P. D. M., ARCE, R. M., GOMES, S. C., OPPERMANN, R. V., &
2553 SUSIN, C. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: a
2554 meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n.9, p.727–745, 2016.
2555 doi:10.1111/jcpe.12557
2556

- 2557 STAROVESKI, T., BREZAK, D., UDILJAK, T. Drill wear monitoring in cortical bone
2558 drilling. **Medical Engineering & Physics**, v. 37, p. 560-566, 2015. DOI:
2559 <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2015.03.014>
2560
- 2561 SUGAWARA, S., UEHARA, A., NOCHI, T., YAMAGUCHI, T., UEDA, H., SUGIYAMA,
2562 A., TAKADA, H. Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by
2563 Human Oral Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v.167, n.11, p. 6568–6575,
2564 2001. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6568
2565
- 2566 TAKAMORI Y, ATSUTA I, NAKAMURA H, SAWASE T, KOYANO K, HARA Y.
2567 Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. **Clinical**
2568 **Oral Implants Research**, v.28, n.2, p. 63-170, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/clar.12777>
2569
- 2570 TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the
2571 immune and bone systems. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 292–304,
2572 2007. DOI:10.1038/nri2062
2573
- 2574 TANAKA, K., MIYAKE, Y., HANIOKA, T., FURUKAWA, S., MIYATAKE, N., &
2575 ARAKAWA, M. The IL18 Promoter Polymorphism, rs1946518, Is Associated with the Risk
2576 of Periodontitis in Japanese Women: The Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study.
2577 **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 243, n.3, p. 159–164,
2578 2017. doi:10.1620/tjem.243.159
2579
- 2580 TETTAMANTI, L. Immediate Loading Implants: Review of The Critical Aspects. **Oral &**
2581 **Implantology**, v.10, n.2, p. 129, 2017. doi:10.11138/orl/2017.10.2.129
2582
- 2583 TONETTI, M.S., JEPSEN, S., JIN, L., OTOMO-CORGEL, J. Impact of the global burden of
2584 periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action.
2585 **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. 456-462, 2017. DOI: 10.1111/jcpe.12732
2586
- 2587 TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.
2588 **Nature Reviews Immunology**, v.3, n.2, p.133–146. doi:10.1038/nri1001
2589
- 2590 TRINDADE, R., ALBREKTSSON, T., TENGVALL, P., WENNERBERG, A. Foreign body
2591 reactions to biomaterials: on mechanisms for buildup and breakdown of osseointegration.
2592 **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 18, p. 192–203, 2016. DOI:
2593 10.1111/cid.12274
2594
- 2595 VAQUETTE, C., SAIFZADEH, S., FARAG, A., HUTMACHER, D. W., & IVANOVSKI,
2596 S. Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets. **Journal of**
2597 **Dental Research**, v.7, p. e1800457, 2019. doi:10.1177/0022034519837967.
2598
- 2599 VON WILMOWSKY, C., MOEST, T., NKENKE, E., STELZLE, F., SCHLEGEL, K.A.
2600 Implants in bone: part I. A current overview about tissue response, surface modifications and
2601 future perspectives. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v.18, n.3, p. 243–257, 2014. doi:
2602 10.1007 / s10006-013-0398-1.

- 2603
2604 WADA, T., NAKASHIMA, T., HIROSHI, N., & PENNINGER, J. M. RANKL–RANK
2605 signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1,
2606 p. 17–25, 2006. DOI:10.1016/j.molmed.2005.11.007
2607
- 2608 WALDMANN, T.A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer
2609 therapy and vaccine design. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p.595–601, 2006. DOI:
2610 10.1038/nri1901
2611
- 2612 WANG, F., GUAN, M., WEI, L., & YAN, H. IL-18 promotes the secretion of matrix
2613 metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF-κB signaling.
2614 **Molecular Medicine Reports**, v. 19, p.703–710, 2019. doi:10.3892/mmr.2018.9697
2615
- 2616 WANG, H.-L., GARAIKOA-PAZMINO, C., COLLINS, A., ONG, H.-S., CHUDRI, R., &
2617 GIANNOBILE, W. V. Protein biomarkers and microbial profiles in peri-implantitis. **Clinical**
2618 **Oral Implants Research**, v. 27, n. 9, 1129–1136, 2015. doi:10.1111/clr.12708
2619
- 2620 YAMAOKA-TOJO M, TOJO T, WAKAUME K, KAMEDA R, NEMOTO S, TAKAHIRA N,
2621 MASUDA T, IZUMI T. Circulating interleukin-18: A specific biomarker for atherosclerosis-
2622 prone patients with metabolic syndrome. **Nutrition & Metabolism** (Lond), v.8, p.3, 2011.
2623
- 2624 YEE, M., KIM, A., ALPAGOT, T., DÜZGÜNEŞ, N., & KONOPKA, K.. Porphyromonas
2625 gingivalis stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. **Microbes and**
2626 **Infection**, v. 14, n. 9, p. 684–689, 2012. DOI:10.1016/j.micinf.2012.03.002
- 2627 YOON, C., JOHNSTON, S. C., TANG, J., STAHL, M., TOBIN, J. F., & SOMERS, W.
2628 S. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine
2629 interleukin-12. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 14, p. 3530–3541,
2630 2000. doi:10.1093/emboj/19.14.3530
2631
- 2632 YOSHINAKA, K., SHOJI, N., NISHIOKA, T., SUGAWARA, Y., HOSHINO, T.,
2633 SUGAWARA, S., SASANO, T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic
2634 periodontitis after bacterial infection. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 23,
2635 p. 215–222, 2014. DOI: 10.1620 / tjem.232.215.
2636
- 2637 YU, P., HU, Y., LIU, Z., KAWAI, T., TAUBMAN, M. A., LI, W., & HAN, X. Local Induction
2638 of B Cell Interleukin-10 Competency Alleviates Inflammation And Bone Loss In Ligature-
2639 Induced Experimental Periodontitis In Mice. **Infection And Immunity**, v.85, n.1,
2640 2016. DOI:10.1128/iai.00645-16
2641
- 2642 ZANI, S.R. et al. Peri-implant crevicular fluid biomarkers as discriminants of peri-implant
2643 health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.43, n. 10. p.825-32, 2016. DOI:
2644 10.1111/jcpe.12586. Epub 2016 Aug 10.
2645
- 2646 ZHANG, X., WANG, Q., YAN, X., SHAN, Y., XING, L., LI, M., & LAI, W. Immune
2647 landscape of periodontitis unveils alterations of infiltrating immunocytes and molecular
2648 networks-aggregating into an interactive web-tool for periodontitis related immune analysis

- 2649 and visualization. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, 2020. doi:10.1186/s12967-
2650 020-02616-1
- 2651
- 2652 ZHOU, P., LIU, J., MERRITT, J., & QI, F. A YadA-like autotransporter, Hag1 in *Veillonella*
2653 *atypica* a multivalent hemagglutinin involved in adherence to oral *Streptococci*,
2654 *Porphyromonas gingivalis*, and human oral buccal cells. **Molecular Oral Microbiology**, v. 30,
2655 n.4, 269–279, 2015. doi:10.1111/omi.12091
- 2656
- 2657 ZHU, W., LEE, S.-W. Surface interactions between two of the main periodontal pathogens:
2658 *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. **Journal of Periodontal & Implant**
2659 **Science**, v. 46, n. 1, p. 2–9, 2016. doi: 10.5051/jpis.2016.46.1.2
- 2660
- 2661
- 2662
- 2663
- 2664
- 2665
- 2666
- 2667
- 2668
- 2669
- 2670
- 2671
- 2672
- 2673
- 2674
- 2675
- 2676
- 2677
- 2678
- 2679
- 2680
- 2681
- 2682
- 2683
- 2684
- 2685
- 2686
- 2687
- 2688

2689
2690
2691
2692
2693
2694
2695
2696
2697
2698
2699
2700
2701
2702
2703
2704
2705
2706
2707
2708
2709
2710
2711
2712
2713
2714
2715
2716
2717
2718
2719
2720
2721
2722
2723
2724
2725
2726
2727
2728
2729
2730
2731
2732

APÊNDICES

2733
2734
2735
2736
2737
2738

APÊNDICE A - ANAMNESE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



TRIÂNGULO MINEIRO- Uberaba-MG

Dados pessoais	
Nome: _____ Data: / /	
Data de nascimento: / /	Idade: _____ Raça: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Negro
Estado civil: _____	Profissão: _____ Gênero: <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino
Endereço: _____ n°: _____	Bairro: _____
Telefone: _____	Celular: _____
Motivo da perda dos dentes: _____	
Sistema cardiovascular: Pressão arterial: _____ Hipertensão arterial () sim () não	
Sistema respiratório (asma, pneumonia, bronquite, enfisema, fibrose...) () sim () não Qual? _____	Sistema genito-urinário (cistite, nefrite, insuficiência renal...) () sim () não Qual? _____
Sistema digestório (gastrites, úlceras...) () sim () não Qual? _____	Distúrbios hemorrágicos (distúrbios de coagulação, púrpuras...) () sim () não Qual? _____
Sistema endócrino (diabetes, paratireoidismo. Tireoidite...) () sim () não Qual? _____	Alergias () sim () não Qual? _____
Discrasias sanguíneas (leucemia, agranulocitose) () sim () não Qual? _____	Doenças infecciosas (hepatite, DST, AIDS, tuberculose...) () sim () não Qual? _____
Sedentarismo () sim () não	Está sob tratamento médico? () sim () não Detalhar _____
Tabagismo () sim () não Quantos cigarros por dia: _____ () ex-fumante Há quanto tempo? _____ () fumante passivo	Índice de massa corporal (IMC) = peso = _____ = _____ (altura) ² peso= _____ altura= _____
Está sob tratamento médico? () sim () não	Faz uso de algum medicamento? () sim () não Quais? _____ _____ _____

Possui alguma neoplasia (tumores)? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual? _____ _____	1) Possui alguma doença auto-imune (pênfigo, tireoidite de Hashimoto ...) <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual? _____ _____
Deficiência de vitamina C? _____ Ingere fontes de vitamina C? _____	Osteoporose <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Já teve problemas periodontite antes da colocação do implante? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se a resposta anterior foi sim: Fez tratamento periodontal? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não quando? _____

Condição dental (coroa)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Dente natural
																1	Ausente
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38	2	Implante

Higienização <input type="checkbox"/> satisfatória <input type="checkbox"/> deficiente	Há antagonista ao implante? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> dente <input type="checkbox"/> prótese removível <input type="checkbox"/> prótese fixa
---	---

Sangramento à sondagem

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Ausência
																1	Presença
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		

Supuração

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	Índice	Condição
																0	Ausência
																1	Presença
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		

Profundidade de sondagem (em milímetros)

Implante (dente)	Recessão	Profundidade de sondagem	Sangramento
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=
	V= L= M= D=	V= L= M= D=	V= L= M= D=

Implante (dente)	Tipo de implante	Data do implante	Data do cicatrizador	Data de instalação da prótese sobreimplante

<input type="checkbox"/> Implante	Índice de Placa	Índice Gingival	Escore – índice de placa		Escore – índice gengival (sangramento)	
<input type="checkbox"/> Dente			0	Sem placa	0	Ausência
			1	Uso de sonda	1	Presença de pontos

				2	Olho nu		2	Colar	
				3	Abundância		3	Abundante	

2739

2740

2741 - Situação do provisório (quando houver): _____

2742 - Contato prematuro? _____ Dente antagonista é dente ou prótese? (de que

2743 material?) _____

2744

2745

2746

2747

Assinatura do paciente

2748

2749

2750

2751 **APÊNDICE B - TERMO DE ESCLARECIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

2752

2753

2754

2755

2756

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO

TRIÂNGULO MINEIRO- Uberaba-MG

2757

2758 **TERMO DE ESCLARECIMENTO**

2759

2760

2761

2762

2763

2764

2765

2766

2767

2768

2769

2770

2771

2772

2773

2774

2775

Peri-implantite é um termo utilizado para identificar o processo de inflamação que ocorre em torno de um implante dentário. O diagnóstico desta doença é extremamente importante, pois se não for identificada e tratada, pode levar à perda do implante. O presente estudo “AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR EM PACIENTES COM GENGIVITE, PERIODONTITE E PERI-IMPLANTITE” tem como objetivo comparar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular peri-implantar de pacientes com e sem peri-implantite. Como os avanços na área da saúde ocorrem por meio de estudos como este, sua participação é importante. Caso você participe, será necessário fazermos coletas de amostra de fluido crevicular peri-implantar, exames radiográficos, perguntas sobre sua saúde geral e odontológica. Este estudo permitirá identificar se você tem peri-implantite e também lhe oferecerá todo o suporte de informações sobre sua prevenção e tratamento. Não será feito nenhum procedimento que traga risco a sua vida ou maior desconforto.

2772

2773

2774

2775

Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Por sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua

2776 responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será
2777 identificado com um número.

2778

2779 **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

2780

2781

2782 Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e
2783 compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação
2784 que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper
2785 minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará
2786 meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei
2787 dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

2788

2789

2790 Uberaba, ___/___/_____

2791

2792

2793

2794 _____
Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

2795

2796

2797

2798 _____
Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

2799

2800 Telefone de contato dos pesquisadores: Sanivia Aparecida de Lima Pereira: (034) 99153-5353

2801 – Juliana Barbosa de Faria: (034) 99684-3480

2802

2803 Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê
2804 Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba, pelo telefone 034 3319-8816.

2805

2806

2807

2808

2809

2810

2811

2812

2813

2814

2815

2816

2817

2818

2819

2820

2821

2822

2823

2824

2825

2826

ANEXOS

2827

2828

2829

2830

2831

2832

2833

2834

2835

2836

2837

2838

2839

2840 ***ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE***
2841 ***ÉTICA EM PESQUISA***

UNIVERSIDADE DE UBERABA -
UNIUBE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR E DA GENGIVA MARGINAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE E COM PERI-IMPLANTITE.

Pesquisador: Sanívia Aparecida de Lima Pereira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64947717.0.0000.5145

Instituição Proponente: Sociedade Educacional Uberabense

Patrocinador Principal: Sociedade Educacional Uberabense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.457.394

Apresentação do Projeto:

O título do projeto em tela é “AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO FLUIDO CREVICULAR E DA GENGIVA MARGINAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE E COM PERI-IMPLANTITE”, e traz a hipótese de que pacientes com periodontite crônica apresentam maior probabilidade de desenvolver peri-implantite.

O projeto está bem fundamentado e traz uma extensa introdução sobre o tema abordando as principais causas e consequências da periodontite e das doenças peri-implantares. Para alcançar os objetivos propostos, os pesquisadores contarão com 30 pacientes com periodontite e indicação de exodontia com posterior instalação de implantes. Estes pacientes foram/serão selecionados no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2018 durante consulta de acompanhamento dos implantes numa clínica odontológica da rede privada na cidade de Uberaba. Após o exame clínico, serão obtidas radiografias intra-orais periapicais para cada dente utilizando a técnica do paralelismo com posicionador radiográfico para avaliar a perda óssea periodontal. Nestes será coletado fluido crevicular e fragmentos de gengiva, antes e após seis meses decorrentes da instalação do implante dentário. O fluido coletado será processado para o ensaio imunoenzimático (ELISA), e os fragmentos de gengiva serão preparados para a imunohistoquímica, ambos com a finalidade de avaliar citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, as amostras serão processadas histologicamente, coradas pelo corante HE para avaliação do processo inflamatório e pelo corante

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 2.457.394

Picrosirius para quantificação de colágeno.

Os critérios de exclusão para a seleção dos pacientes serão os seguintes: realização de terapia periodontal há menos de 1 ano; presença de doenças sistêmicas relevantes; uso de antibióticos ou anti-inflamatórios nos últimos seis meses; pacientes fumantes, etilistas crônicos; pacientes com doenças sistêmicas; gestantes; lactantes; implantes com mobilidade ou supuração e aqueles pacientes que não concordarão assinar o termo de consentimento.

As análises estatísticas serão realizadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para a avaliação da normalidade, e Mann Whitney para variáveis com distribuição não-normal quando realizada a comparação entre os dois grupos (com ou sem peri-implantite). Para variáveis qualitativas (masculino/feminino; caucasiano/não caucasiano) será utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância assumido será de 5% ($p < 0,05$).

Os pesquisadores esperam que os dados obtidos possam auxiliar em traçar um perfil de resposta imunológica que compare as duas doenças em um único paciente, com a finalidade de prevenir insucessos na evolução da osseointegração dos implantes dentários.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar avaliação imunológica do fluido crevicular e da gengiva marginal em pacientes com periodontite e peri-implantite.

Objetivo Secundário:

Comparar a intensidade de inflamação, a porcentagem de colágeno e a expressão de citocinas no fluido crevicular e na gengiva antes e após 1 ano da instalação do implante dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

De acordo com os proponentes “não haverá riscos para o paciente porque a coleta do fluido crevicular não provocará dor nem desconforto. Da mesma forma a coleta dos fragmentos de gengiva serão realizadas sob anestesia local e como forma do tratamento dos pacientes com peri-implantite ou periodontite. Dos pacientes controles serão coletados fragmentos do tecido peri-

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br



Continuação do Parecer: 2.457.394

implantar na região adjacente à gengiva que será aberta para colocação de um novo implante. Não haverá perda de confidencialidade, pois os pacientes serão identificados por números”.

Benefícios

Os benefícios estão voltados em traçar um perfil de resposta imunológica que compare essas duas doenças em um único paciente, com a finalidade de prevenir insucessos na evolução da osseointegração dos implantes dentários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto está bem fundamentado e a metodologia atende aos princípios éticos em pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está devidamente assinada, indicando corretamente a Instituição proponente (Universidade de Uberaba); além disso, o declarante menciona estar ciente da resolução 466/12, a qual será cumprida;

A carta de autorização da Policlínica Getúlio Vargas, onde as amostras serão coletadas, está devidamente assinada pelo prof. Anderson Silva CRO-16754-MG, e com a ciência do prof. Dr. Luis Henrique Borges, diretor do curso de Odontologia da UNIUBE.

O TCLE vem com uma linguagem mais acessível ao público, embora ainda encontramos alguns termos de difícil entendimento ao leigo como a transcrição do objetivo da pesquisa dentro do mesmo. Contudo, este é explicado ao longo do termo. Os benefícios são apresentados, assim como medidas para evitar eventual perda da confidencialidade. Além disso, traz o cabeçalho correto e os contatos do responsável pela pesquisa, da Policlínica e do CEP da UNIUBE.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os proponentes adequaram o projeto, TCLE e encaminharam a carta de autorização da Policlínica.

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

Continuação do Parecer: 2.457.394

De acordo com a avaliação realizada assinalo o referido projeto como APROVADO, salvo melhor juízo feito pelos membros do CEP-UNIUBE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em 21/12/2017 a plenária votou de acordo com o relator, pela aprovação da proposta, lembrando o proponente do compromisso com o que trata as Resoluções 466/12 e 510/2016, especialmente no que diz respeito a entrega dos Relatórios Parcial e Final da pesquisa ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_832915.pdf	05/12/2017 15:31:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	04/12/2017 16:48:14	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito
Parecer Anterior	PARECER.pdf	04/12/2017 16:22:16	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	04/12/2017 15:42:22	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito
Folha de Rosto	folhoderosto.pdf	04/12/2017 14:43:53	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito
Outros	Autorizacaoll.jpeg	04/12/2017 14:41:42	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito
Outros	Autorizacao.jpeg	04/12/2017 14:36:15	Sanívia Aparecida de Lima Pereira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

UNIVERSIDADE DE UBERABA -
UNIUBE



Continuação do Parecer: 2.457.394

UBERABA, 27 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Geraldo Thedei Junior
(Coordenador)

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

***ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO:
IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF
THE CREVICULAR FLUID IN
PATIENTS WITH GINGIVITIS,
PERIODONTITIS, AND PERI-
IMPLANTITIS: A 1-YEAR CROSS-
SECTIONAL STUDY***

Immunological evaluation of the crevicular fluid in patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis: a 1-year cross-sectional study

Avaliação imunológica do fluido crevicular em pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite: um estudo transversal de 1 ano

Evaluación inmunológica del líquido crevicular en pacientes con gingivitis, periodontitis y periimplantitis: un estudio transversal de 1 año

Received: 09/17/2021 | Reviewed: 09/27/2021 | Accept: 10/02/2021 | Published: 10/04/2021

Juliana Barbosa de Faria

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9681-2278>
Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: julibfaria@hotmail.com

Taíssa Cássia de Souza Furtado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8186-1798>
University of São Paulo, Brazil
E-mail: taissacassia@hotmail.com

Thaís Soares Farnesi de Assunção

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3415-9004>
University of Federal Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: thais.assuncao@uftm.edu.br

Douglas Reis Abdalla

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6971-1201>
Centro Universitário UniBrasilia, Brazil
E-mail: profdouglasabdalla@gmail.com

Fabiane Minin Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6156-3988>
University of Uberaba, Brazil
E-mail: fabianeminin@gmail.com

Bárbara Bellocchio Bertoldo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0628-9792>
Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: barbarabellocchiob@hotmail.com

Eleonora de Paula Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3107-2002>
University of Uberaba, Brazil
E-mail: eleonoramaral@yahoo.com

Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4003-542X>
University of Uberaba, Brazil
Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: denise.rodrigues@uniube.br

Virmondes Rodrigues Júnior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8706-4223>
Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: virmondes.rodrigues@uftm.edu.br

Sanivia Aparecida de Lima Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2587>
University of Uberaba, Brazil
Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil
E-mail: sanivia.pereira@uniube.br

Abstract

Objective: To assess the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) and peri-implant crevicular fluid (PICF) in patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis before and one year after implant installation. **Material and Methods:** Forty-nine samples of GCF and PICF were collected from March 2018 to March 2019. The patients were classified: patients with gingivitis (n=7), patients with periodontitis (n=14), patients with peri-implantitis (n=4) and healthy patients (n=24). The crevicular fluid from the 49 patients was collected before implant installation (n=8) and one year after implant placement (n=8). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to evaluate the levels of cytokines in crevicular fluid. **Results:** Patients with gingivitis,

periodontitis, and peri-implantitis showed higher concentrations of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 when compared with control group. In general, the levels of IL-12 and IL-15 increased when compared to the moments before and after implant installation. There was also an increase in the concentration of IL-18 in the control group volunteers after implant installation. Conclusion: The results and methodology of this study showed that there was no difference in the synthesis of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in healthy individuals or in those with periodontal injuries. However, there was an increase in the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 one year after implant installation, which would be increasing the inflammatory activity in peri-implantitis.

Keywords: Cytokines; Periodontal diseases; Gingival crevicular fluid; Peri-implantitis.

Resumo

Objetivo: Avaliar os níveis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 no fluido crevicular gengival (FCG) e peri-implantar (FCPI) de pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite antes e um ano após a instalação do implante. **Material e Métodos:** Quarenta e nove amostras de FCG e FCPI foram coletadas entre março de 2018 a março de 2019. Os pacientes foram classificados de acordo com a situação periodontal ou peri-implantar: pacientes com gengivite (n=7), pacientes com periodontite (n=14), pacientes com peri-implantite (n=4) e pacientes saudáveis (n=24). Desses 49 pacientes, foi coletado fluido crevicular antes da instalação do implante (n=8) e um ano após a instalação do implante (n=8). O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi usado para avaliar os níveis de citocinas no fluido crevicular. **Resultados:** Pacientes com gengivite, periodontite e peri-implantite apresentaram maiores concentrações de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 quando comparados ao grupo controle. Em geral, os níveis de IL-12 e IL-15 aumentaram quando comparados aos momentos antes e após a instalação do implante. Também houve aumento na concentração de IL-18 nos voluntários do grupo controle após a instalação do implante. **Conclusão:** Os resultados e a metodologia deste estudo mostraram que não houve diferença na síntese de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 em indivíduos saudáveis ou com lesão periodontal. Porém, houve aumento das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 um ano após a instalação do implante, o que estaria aumentando a atividade inflamatória na peri-implantite.

Palavras-chave: Citocinas; Doenças periodontais; Líquido do sulco gengival; Peri-implantite.

Resumen

Objetivo: Evaluar los niveles de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en el líquido crevicular gingival (LCG) y en el líquido crevicular periimplantar (LCP) de pacientes con gingivitis, periodontitis y periimplantitis antes y un año después de la colocación del implante. **Material y métodos:** Se recogieron 49 muestras de FCG y FCPI entre marzo de 2018 y marzo de 2019. Los pacientes se clasificaron según el estado periodontal o periimplantar: pacientes con gingivitis (n=7), pacientes con periodontitis (n=14), pacientes con periimplantitis (n=4) y pacientes sanos (n=24). De estos 49 pacientes, se recogió líquido crevicular antes de la instalación del implante (n=8) y un año después de la instalación del implante (n=8). Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar los niveles de citoquinas en el líquido crevicular. **Resultados:** Los pacientes con gingivitis, periodontitis y periimplantitis presentaban mayores concentraciones de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en comparación con el grupo de control. En general, los niveles de IL-12 e IL-15 aumentaron en comparación con los momentos anteriores y posteriores a la instalación del implante. También se produjo un aumento de la concentración de IL-18 en los voluntarios del grupo de control tras la instalación del implante. **Conclusión:** Los resultados y la metodología de este estudio mostraron que no había diferencias en la síntesis de IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32 en sujetos sanos o en sujetos con lesiones periodontales. Sin embargo, hubo un aumento de las citocinas IL-12, IL-15 e IL-18 un año después de la instalación del implante, lo que aumentaría la actividad inflamatoria en la periimplantitis.

Palabras clave: Citoquinas; Enfermedades periodontales; Líquido del surco gingival; Periimplantitis.

1. Introduction

Periodontal diseases are inflammatory processes that start in the gingiva as a response to bacterial antigens that accumulate on the dental plaque throughout the gingival margin. The plaque is a biofilm formed by bacteria, salivary proteins, and desquamated epithelial cells. Bacteria trigger the production of cytokines and chemokines on the gingival epithelium, leading to the expression of adherence molecules and to the increase of the permeability of gingival capillaries and of the chemotaxis of neutrophils through the junctional epithelium into the gingival sulcus (Silva et al., 2015). The earlier manifestation of the periodontal disease is gingivitis, which is characterized by hyperemia, edema, and gingival bleeding. When gingivitis is not treated early, it can evolve into a periodontitis, which is characterized by the loss of the insertion of the periodontal tissue that gives support and protection to the dental element. Therefore, the periodontitis affects deeper structures, causing the resorption of the collagen fibers of the periodontal ligament, the resorption of the alveolar bone, abscesses, increase of the gingival sulcus depth, greater tooth mobility, and loss of the dental element (Zhang et al., 2020).

The progression of the periodontal disease does not depend only on the bacteria, but also on the immunological response. Consequently, the immune response of the host has an essential role in the balance between the destruction and the recovery of the periodontal tissue. Therefore, current researches about periodontal diseases have focused on the immunological responses involved in them (Zhang et al., 2020).

On the other hand, the bacteria in the biofilm can also provoke revertible inflammation on the mucosa that surrounds dental implants (peri-implant mucositis) and irreversible injuries in the tissue that sustains these implants (peri-implantitis) (Rinke et al., 2020). This can trigger marginal bleeding, mobility, and loss of the implanted dental element, compromising both aesthetic and function. Similarly to periodontal diseases, the cytokines released in the site contribute for the progress of these diseases (Ali et al., 2021). However, these peri-implant diseases are still not fully understood. So far there is no consensus on the etiologies and pathogenesis, especially when compared to periodontitis (Kalsi, Moreno, & Petridis, 2021).

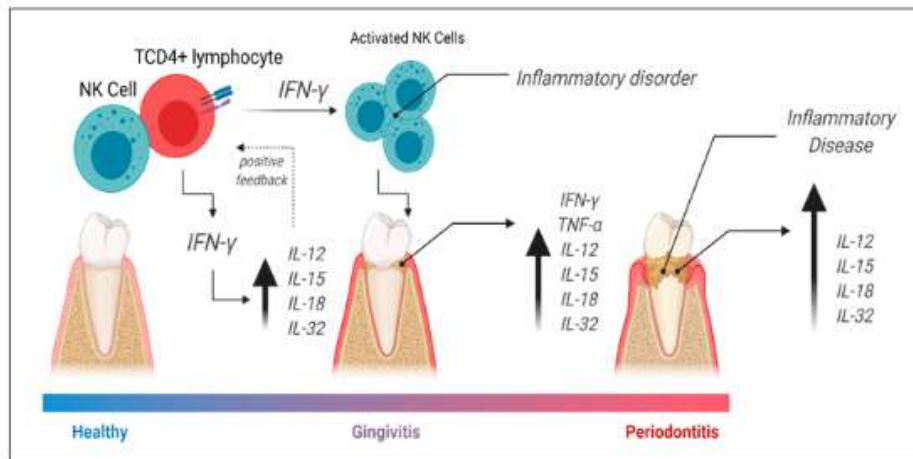
However, the installation of dental implants brings great benefits to patients and has contributed to reducing the number of edentulous patients worldwide. The treatment of edentulism with dental implants is a routine treatment in daily dental practice and is becoming more and more widespread over the years (Kormas et al., 2020). Although there has been a great advance in the area of these implants in recent years, the number of failures related to inflammation of the peri-implant tissue has also increased. Currently, the prevalence of periimplant diseases is high, with 43% progressing to periimplant mucositis and 22% progressing to periimplantitis (Rinke et al., 2020).

The number of studies in this area is growing in order to understand the immunological mechanism involved in the progression of these diseases, since the assessment of inflammatory cytokine levels in periodontal and peri-implant diseases can allow the identification of the active disease, contributing to the diagnosis and early treatment (Ali et al., 2021).

The present study was carried out aiming to contribute for the understanding of tissue injury in gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis, starting from the principle that interleukins (IL) and other cytokines stimulate cells from several different lineages and differentiation stages.

Figure 1 summarizes the behavior of the immune response during the establishment and development of the periodontal lesion. During gingivitis and, later, periodontitis, immune cells, such as TCD4⁺ lymphocytes and NK cells are activated and produce IFN- γ , a key cytokine for other interleukins to be activated, such as IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 (Zhuang et al., 2018). Once these cytokines are produced, a feedback loop is activated, more IFN- γ is produced and more NK cells are activated, creating a serious inflammatory disorder (Pradeep et al., 2009). This disorder is characterized by high levels of IL-12, IL-15, IL-18, IL-32, which are proinflammatory cytokines, related to the liberation of other proinflammatory cytokines (IFN- γ and TNF- α) (Nakanish et al., 2001) and chemokines. This group of cytokines (Interleukins 12, 15, 18, and 32) have proteolytic action, thus acting in the progression of inflammatory diseases such as gingivitis and periodontitis (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007).

Figure 1 - Relation between IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32.



Created by BioRender.com. Source: Authors (2021).

Although there are studies that evaluated the immune response in periodontal and peri-implant tissues (Ali et al., 2021), this is the first study to simultaneously compare the levels of IL-12, IL-15, IL-18 and IL-32 in the crevicular fluid from patients with gingivitis, periodontitis and periimplantitis. Also, the first study to compare all these cytokines simultaneously, before and one year after the installation of dental implants.

As all the immunological mechanisms involved in these diseases are not yet understood, the results of the present study will allow us to bring new knowledge for better understanding of the pathogenesis of periodontal and peri-implant diseases. This study can contribute to a better quality of life for people, since the understanding of the mechanisms of these diseases can collaborate in the adoption of prophylactic and therapeutic measures in order to prevent the loss of teeth and dental implants. Knowing the importance of teeth for aesthetic, mastication, and phonetics is enough to justify the need to understand the pathogenesis of these diseases.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival fluids of patients with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis, before the extraction of the teeth and one year after the placement of dental implants.

2. Methodology

Selection of patients

This prospective cross-sectional study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the University of Uberaba/MG, Brazil, under protocol number 2.457.394, CAAE: 64947717.0.0000.51. All eligible patients were informed about the nature of the study and about the potential risks and benefits of participating by signing the Informed Consent Form. The clinical investigation was carried out according to the principles from the Declaration of Helsinki. The patients were selected during the peri-implant support therapy, from March 2018 to March 2019, in the Getúlio Vargas Polyclinic from the University of Uberaba/MG, in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Medical and odontological information were obtained from the patients, who agreed participating in the study and were in accordance with the inclusion/exclusion criteria.

Forty-nine patients were selected and classified according to their periodontal situation: patients with gingivitis (n=7), patients with periodontitis (n=14), patients with peri-implantitis (n=4), and healthy patients (n=24). The crevicular fluid from the 49 patients was collected before (n=8) and one year the placement of the implant (n=8). In this group (n=8) the patients

were classified according to their periodontal situation: patients with gingivitis (n=4), patients with periodontitis (n=3), patients with peri-implantitis (n=1).

For the selection criteria of teeth and implant for collection, the tooth and implant with the greatest probing depth were selected. Importantly, all patients in the study received implants and most patients had more than one implant in their oral cavity. When a patient had periodontitis or peri-implantitis in more than one site, the one with the greatest probing depth was selected.

The inclusion criteria for the selection of patients were: 1. Healthy patients: absence of gingival erythema, bleeding on probing, edema, suppuration, and no increase in probing depth when compared to previous exams (Berglundh et al., 2018). Furthermore, the patients had to be in a good general state of health, not having para-functional habits, and sign the Free and Informed Consent Form; 2. Patients with gingivitis: probing depths of up to 3mm, 10% or more places with bleeding on probing, no clinical attachment loss or radiographic bone loss (Chapple et al., 2018); 3. Patients with periodontitis: clinical attachment loss detected in one or more interproximal non-adjacent sites or loss of insertion of 3mm or more in the vestibule or lingual/palate in at least two teeth, as long as not caused by: a) traumatic gingival recession; b) dental cavity reaching the cervical area of the teeth; c) loss of insertion in the distal surface of a second molar and associated to the bad position or extraction of a third molar; d) endoperiodontal lesion draining through the marginal periodontium or e) vertical root fracture (Tonetti, Greenwell, & Kornman, 2018; Papapanou et al., 2018); 4. Patients with peri-implantitis: a) signs of peri-implant inflammation (gingival erythema, bleeding at probing, edema, suppuration, and increase in probing depth when compared to previous exams), b) radiographic evidence of bone loss after initial healing, and c) radiographic bone level ≥ 3 mm accompanied by bleeding at probing and probing depth ≥ 6 mm (Renvert et al., 2018).

The exclusion criteria to select the patients were: prior periodontal or peri-implant therapy for at least one year, relevant systemic diseases not-compensated for, such as diabetes and osteoporosis; the use of antibiotics or anti-inflammatory in the last six months; smoking; chronic alcoholics; pregnant women; implants with mobility or suppuration, and those who did not accept signing the Consent Form (De Araújo et al., 2017).

The following parameters were evaluated in six sites of each implant (mesial-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesial-lingual, lingual, and disto-lingual), using a periodontal probe (PCPUNC-15BR Hu-Friedy, São Paulo, Brazil): (a) marginal bleeding - the presence or absence of bleeding was recorded by passing of the periodontal probe alongside the margins of the soft tissue; (b) suppuration - presence or absence of suppuration, spontaneous or when probing; (c) probing depth - distance in millimeters from the margin of the mucosa to the bottom of the sulcus or the peri-implant pocket (De Mendonça et al., 2009).

Collection of peri-implant and gingival fluid

For the collection of gingival and peri-implant fluid, selected teeth or implants were isolated using sterile gauze and the collection places were softly dried with an air syringe. Four absorbent paper points number 40 were placed, isolated, in each place of collection (mesial-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesial-lingual, lingual, disto-lingual), for approximately 2 mm in the sulcus/pocket for 30 seconds each. Points contaminated by blood or saliva were discarded. Later, the points were placed in an epperndorf tube with a 0.5 Phosphate-Buffered Saline (PBS) buffer solution, pH 7.2, composed by 1.9g monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), 5.1 g sodium phosphate (Na_2HPO_4), 42.5 g sodium chloride (NaCl), and 500 ml ultrapure water, distilled in a Milli Q® (Millipore) device and frozen at -70°C (Escobar et al., 2018).

Quantification of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) and the peri-implant crevicular fluid (PICF)

The samples collected were analyzed through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 using specific antibody pairs commercially available, according to the recommendations of the manufacturer (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). The following kits from R&D Systems were used: a) Human IL-12 p70 Quantikine ELISA Kit – listing number: D1200; b) Human IL-15 Quantikine ELISA Kit – listing number: D1500; c) Human Total IL-18 DuoSet ELISA – listing number: DY318-05; d) Human IL-32 DuoSet ELISA – listing number: DY3040-05. High-sensitivity 96 well flat bottom plates (Microplate, PS, half area, high binding, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Later, they were cleaned using PBS/Tween 0.05% in an automated cleaner, blocked with 150 μ l of PBS/BSA 1% (at least one hour, room temperature) and cleaned again using PBS/Tween 0.05%. The samples were added to the wells of the plates and, in parallel, a standard curve was incorporated through serial dilutions of the respective recombinant cytokine. The samples throughout the curve were incubated through night at 4°C. The wells were then cleaned using PBS/Tween 0.05% and, later, 50 μ l/well were inserted with their respective detection antibodies. They remained for three hours in room temperature and were later cleaned using the PBS/Tween 0.05%. After this stage, 50 μ L/well of alkaline phosphatase were pipetted with streptavidin in PBS/BSA 1%, remaining in room temperature and protected from direct light for two hours. Later, the plates were cleaned using PBS/Tween 0.05%, after which 50 μ l/well of the substrate solution were added. The reaction was interrupted using a 2N of H₂SO₄ solution. The results were found using absorbance measures of 450 nm and 570 nm in an automated ELISA reader (Enspire, Perkin Elmer, EUA). The concentrations of the mediators were determined using a linear regression with the absorbance values found in the curves and expressed in pg/mL. The results were calculated using standard curves created in each assay, and the absorbance was found comparing the difference between the first and the second wavelengths (R&D SYSTEMS, 2020). The ELISA assay was blind.

Quantification of total proteins (TPs)

The concentration of cytokines indicated by the automated ELISA reader (Enspire, Perkin Elmer, USA) was corrected according with the total concentration of total proteins (TPs) in the crevicular fluid. To do so, 2 μ L of the sample of crevicular fluid were analyzed in a Spectrophotometer NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). The samples were considered adequately pure when the ratio between absorbances, for 230nm (Green & Sambrook, 2018).

Statistical Analysis

The statistical analysis was carried out using Excel 2013 for Windows (Microsoft - EUA), GraphPad Prism, version 8. The Shapiro-Wilk Test was used to verify the normal distribution of the quantitative variables. The continuous variables, which present normal distribution, were expressed in mean \pm standard deviation. For the multiple comparisons, the ANOVA test and Tukey's test were used. Student's t-test was used for single comparisons. Variables that did not have normal distribution were expressed in median, minimum, and maximum. For the multiple comparisons, the Kruskal-Wallis and Dunn's tests were used. For single comparisons, Mann-Whitney's test was used. The significance level assumed for the variables was 5% ($\alpha=0.05$).

3. Results

The concentration of cytokine dosages between control voluntaries and those affected by gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis can be seen in table 1. There were no statistically significant differences regarding the concentrations of IL-12

($p=0.5222$), IL-15 ($p=0.8463$), IL-18 ($p=0.9980$), and IL-32 ($p=0.4039$) between the control volunteers and those affected by gingivitis, periodontitis, or peri-implantitis (Table 1).

Table 1 - Representation of the dosage of cytokine in control group patients and those with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis.

	IL-12 ^a (n=49)	IL-15 ^b (n=49)	IL-18 ^c (n=49)	IL-32 ^d (n=49)
Control	23.7 (2.7-363.5)	34.1 (5.7-263.5)	24.6 (4.0-213.5)	12.2 (0.0-711.6)
Gingivitis	19.8 (7.3-57.4)	30.3 (9.0-60.0)	22.5 (19.0-39.7)	7.3 (0.0-73.7)
Periodontitis	38.9 (5.4-97.1)	39.1 (8.0-75.7)	26.6 (3.7-51.79)	0.0 (0.0-124.8)
Peri-Implantitis	17.0 (12.9-46.3)	24.2 (20.3-48.4)	24.1 (17.1-33.5)	7.0 (0.0-136.8)

^a Kruskal-Wallis test with $p=0.5222$;

^b Kruskal-Wallis test with $p=0.8463$;

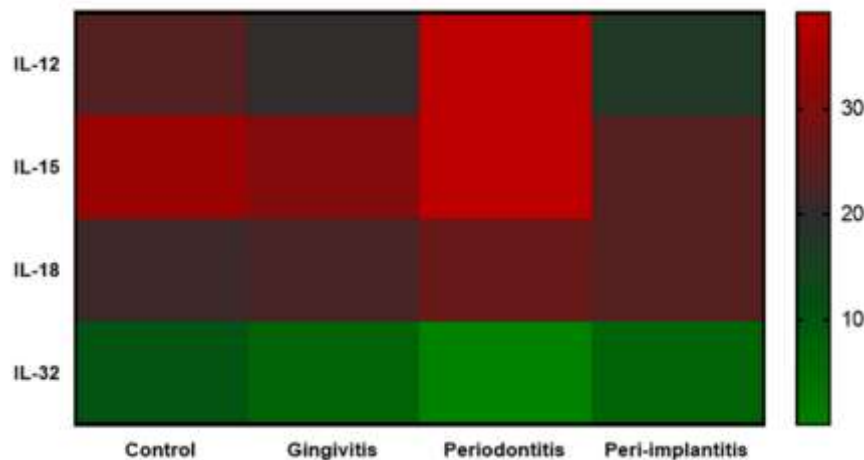
^c Kruskal-Wallis test with $p=0.9980$;

^d Kruskal-Wallis test with $p=0.4039$.

Source: Authors (2021).

Figure 2 is a residual representation of the dosage of interleukins, to show that the concentrations of cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 were higher in the crevicular fluid of the group with periodontitis, when compared to the other groups.

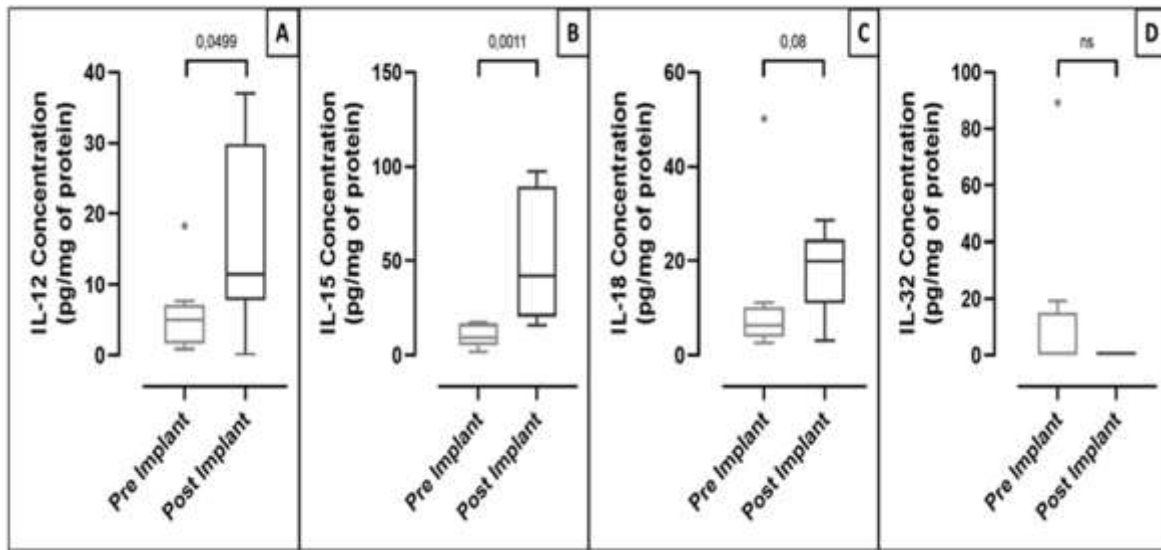
Figure 2 - Heat map representation of cytokines IL-12, IL-15, IL-18 E IL-32, comparing the experimental group volunteers (n=49).



Source: Authors (2021).

Regarding the expression of cytokines IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 between volunteers who received implants, figure 3 shows the analysis of the moments before the implant and one year after the implant. The levels of IL-12 ($p=0.0499$) and IL-15 ($p=0.0011$) increased after the implant, as shown in images 3A and 3B, respectively. The concentrations of IL-18 ($p=0.08$) also increased when the moment before the implant was compared with one year later (Figure 3C), there was no statistically significant difference. Finally, the IL-32 were lower after one year of the implant, albeit with no statistical difference (Figure 3D).

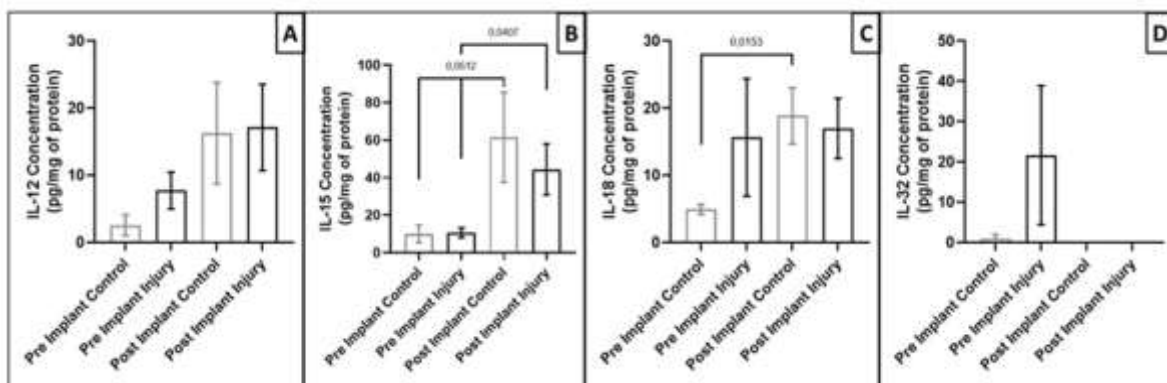
Figure 3 - Representation of the dosages of cytokines comparing the moments before and after the implant. ^aMann Whitney, IL-12: $p=0,0499$; ^bMann Whitney, IL-15: $p=0,0011$; ^cMann Whitney, IL-18: $p=0,08$; ^dMann Whitney, IL-32: $p=1$; (n=8)



Source: Authors (2021).

Figure 4A shows the cytokines IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 before and after the implant, between control volunteers and those with periodontal injuries (gingivitis and/or periodontitis). Regarding the IL-12 dosages, in Figure 4A, this cytokine increased after the implant, both for control volunteers and for volunteers with periodontal injuries. However, this result was not statistically significant. The dosages of IL-15 (Figure 4B) increased after the implant in both groups. However, in the control group, this increase trended towards a statistically significant result ($p=0.0512$), while in the group with periodontal injuries there was a significant increase in IL-15 concentration ($p=0.0407$). Finally, there was also an increase in the IL-18 concentration ($p=0.0153$) among control volunteers, when the moments before and after the implant were compared (Figure 4C).

Figure 4 - Representation of the dosages of cytokines, comparing moments before and after the implant, between control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis). ^bKruskal-Wallis test and Dunn's post test, IL-15: $p=0.0512$ before implant control vs. after implant control; ^bKruskal-Wallis test and Dunn's post test, IL-15: $p=0.0407$ before implant lesion vs. after implant lesion; ^cKruskal-Wallis test and Dunn's post test, IL-18: $p=0.0153$ before implant control vs. after implant control; (n=8).



Source: Authors (2021).

Regarding Figure 5, it is a residual representation of cytokine concentrations. It is possible to notice that there was an increase in the concentration of the IL-12, IL-15, and IL-18 cytokines when we compare the moments before the implant in control volunteers and in those with injuries (gingivitis and/or periodontitis). There was also an increase in the concentration of cytokines IL-12 and IL-15, when the moment after the implant is compared between control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis) (Figure 5).

Figure 5 - Heat map representation of cytokines IL-12, IL-15, IL-12, and IL-32, comparing moments before and after the implant, between control volunteers and those with injuries (gingivitis and/or periodontitis) (n=8).



Source: Authors (2021).

4. Discussion

The null hypothesis was not rejected in this study, since there was no significant difference between the cytokines analyzed in the control group and the groups with gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis. Regarding the analysis of the cytokines before and after the implant, the null hypothesis was rejected for cytokines IL-12, IL-15, IL-18, because a significant difference was observed.

We evaluated the patients one year after they had an implant placed, since the functional load can collaborate for marginal bone loss around the implants.⁴¹ According to the literature consulted, this is the first study that simultaneously compared the levels of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in the gingival crevicular fluid (GCF) of patients with gingivitis and periodontitis, in addition to the peri-implant crevicular fluid (PICF) in peri-implantitis, using the ELISA method.

Our study did not observe statistically significant differences regarding IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 concentrations between control volunteers and those affected by gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis, corroborating a previous study in which the authors showed that the profile of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL1- β , TGF- β 2) in the periodontal tissue, measured by the method ELISA, was similar to the peri-implant tissue at three different points in time (0, 21, 90 days) after the placement of the implant (Schierano et al., 2008). A previous study found, opposed to these findings, that IL-12 and IL-18 induced severe inflammatory disturbance, suggesting that IL-18 is a potent proinflammatory cytokine with a physiopathological role in many inflammatory conditions (Pradeep et al., 2009). Furthermore, IL-32 is known to be secreted by several cells after the stimulation of some inflammatory cytokines, such as IL-12, IL-1b, IFN- γ , IL-18. The IL-32 is an inflammatory cytokine produced by lymphocytes, epithelial cells activated by IFN- γ , NK cells (Goda et al., 2006).

Furthermore, the IL-32 acts over macrophages/monocytes, encouraging the synthesis of TNF- α and IL-6, as well as inducing the secretion of chemokines (IL-8 and MIP-2), being important in the triggering and persistence of the inflammatory process (Kim et al., 2005). Still regarding IL-32, this cytokine antagonizes the activation of NK cells to inhibit phosphorylation of STAT5 mediated by IL-15, suppressing its expression of an effector molecule induced by IL-15, with cytolytic capacity (Gorvel et al., 2017). IL-15, in turn, controls the liberation of IL-18 by human monocytes, creating a proinflammatory environment, as induced by IFN- γ (Sattler et al., 2015). The combination of IL-15 and IL-18 could induce the expression of IFN- γ and granzyme B, suggesting that when these cytokines act together, they are more potent (Ussher et al., 2013). Interleukins IL-15 and IL-32 contributed together to cause physiopathological events that include cell death, inflammation, allergy, and epithelial cell autoimmunity (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007). Although the human recombinant IL-32 induces the production of many proinflammatory cytokines and chemokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007), our study suggests that IL-32 may have contributed for the non-activation of IL-12, IL-15, IL-18, inhibiting the levels of these cytokines in the gingival crevicular fluid (GCF) and in the peri-implant crevicular fluid (PICF).

Cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 presented higher levels in the group with periodontitis when compared to the other groups. Furthermore, after the implant, there was an increase in the concentration of cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 when compared to the moment one year after the implant, for both the control and injured patients. This can be made clear by the fact that the human NK cells show an adaptive behavior in response to a combination of proinflammatory cytokines, such as interleukins IL-12, IL-15, and IL-18. (Romee et al., 2016). All cytokines mentioned lead to the generation of NK cells with functional "memory" properties (Zhuang et al., 2018). It has been shown that the cell line of monocytes and macrophages can respond to the encouragement of IL-15, increasing IL-18 and IL-12 (Bannwart et al., 2007). Furthermore, the IL-18 is a cytokine responsible for the beginning and progression of the periodontal disease (Figueredo et al., 2008). Therefore, the periodontal inflammation may not be resolved successfully due to the accumulation of IL-18. A previous study showed that levels of IL-18 in GCF increased in places where there was periodontitis, suggesting that this cytokine is associated to the severity of the periodontal disease (Orozco et al., 2006). The same thing was verified in the previous study in which the IL-18 had an extremely important role in gingival inflammation and a strong expression of IL-18 was found in gingival samples with the increase of the sulcus depth (Johnson & Serio, 2005). Therefore, in our study, we suggest that this combination of IL-12/15/18 cytokines has the same function in the generation of NK cells. Furthermore, the activity of IL-18 often requires co-stimulating factors to respond, such as IL-12 or IL-15, which is why we believe that IL-18 may have interfered in the results of patients with periodontal diseases.

The levels of IL-12 and IL-15 increased after the implant. Regarding the IL-12 dosages, this cytokine increased after the implant, both for control volunteers and for volunteers with periodontal injuries. However, this result was not statistically significant. The IL-15 dosages, comparing the moments before and after implant, increased for both groups. However, it also trended towards a significant increase in the control group. There was also an increase in the concentration of cytokines IL-12 and IL-15 when we compare the moment after the installation of the implant, comparing control volunteers and those who had injuries (gingivitis and/or periodontitis). The combination of IL-15 and IL-12 contributes for the production of IFN- γ , TNF- α , and GM-CSF by human NK cells (Carson et al., 1995). Additionally, the synergy between IL-12 and IL-15 is responsible for inducing the response of Th1 cells against infections by intracellular microorganisms (Yoshikai & Nishimura, 2000). Therefore, both IL-15 and IL-12, produced by activated human monocytes, had a critical role as cofactors in the production of IFN- γ by NK cells, which is important to activate monocytes and for the development of an effective innate immune response for infections, before the appearance of antigen-specific T cell responses (Carson & Caligiuri, 1998). As a result, we suggest that cytokines IL-12 and IL-15, which contribute for the production of IFN- γ , could be the key for the generation of NK cells,

which are important components of innate bacteria immunity, acting in the development of inflammations due to their quick response and to their intimate relation with the production of proinflammatory cytokines, leading to peri-implantitis.

There was a significant increase in IL-15 in the group with periodontal injuries. These results corroborate the previous study, according to which the total amount of IL-15 in the GCF of the group with gingivitis was significantly higher when compared to the healthy controls (Buduneli et al., 2003). Since the IL-15 is a proteolytic proinflammatory cytokine, it is superexpressed in several inflammatory diseases such as gingivitis and peri-implantitis. The proinflammatory cytokine IL-15 is more present in tissue injuries and in the fluids of chronic inflammatory diseases (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007). Furthermore, an *in vitro* study showed that IL-15 induced the expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) by peripheral blood monocytes. The authors found that IL-15, produced in inflammation sites, may play an essential role in the regulation of blood leukocytes (Badolato et al., 1997). Our findings suggest that IL-15, since it is a proinflammatory cytokine, may be pronounced in tissue injuries and in the fluids of chronic inflammatory diseases, justifying its superexpression in our studies in the groups with gingivitis and periodontitis.

No statistically significant difference was found regarding the concentrations of IL-18, although the cytokine increased after the implant. The results corroborate another study which showed a gradual increase in the concentration of IL-18 in the peri-implant crevicular fluid after 3 months of functioning (Hu et al., 2019). The IL-18 increased one year after the implant was placed, since it is a proinflammatory cytokine that can induce IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , and IL-1 in immunocompetent cells, which can activate cell death by lymphocytes and regulate the expression of certain chemokine receptors (Nakanishi et al., 2001). As a result, we believe that the increase in IL-18 one year after the implant was placed is associated to an intensified proinflammatory activity, indicating local inflammation, which suggests peri-implantitis.

Although the levels of IL-32 were lower one year after the implant, this diminution was not significant, and it is known that human recombinant IL-32 induces the production of several proinflammatory cytokines and chemokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007). This cytokine is produced mainly by T lymphocytes, NK cells (Novick et al., 2006) and by dendritic cells, when stimulated by IL-15 (Gorvel et al., 2017). Furthermore, IL-32 is secreted by several cells after the stimulation of certain inflammatory cytokines, such as IL-12, IL-1b, IFN- γ , IL-18 (Goda et al., 2006). IL-32 acts on macrophages/monocytes, stimulating the synthesis of TNF- α and IL-6, inducing the secretion of chemokines (IL-8, MIP-2). As mentioned above, although the IL-32 induces the production of several proinflammatory cytokines (Conti, Youinou, & Theoharides, 2007) and is important in the triggering and persistence of the inflammatory process (Kim et al., 2005), although in our study suggests that the suppression of IL-32 interfered with the results. In addition, no studies were found in literature that related IL-32 to peri-implantitis.

Considering this, it is essential to trace an immune response profile that compares periodontal diseases and peri-implantitis, since it is known that patients with periodontal diseases are more likely to develop peri-implant diseases (Sgolastra et al., 2013).

This study had limitations, once we obtained a reduced number of samples, as it was not possible to collect samples from all patients one year after implants installation. This study evaluated the local immune responses of gingivitis, peri-implantitis, and periodontitis in two moments: before and after the implant was placed. As a result, there was a prospective evaluation one year after the placement of the implant.

5. Conclusion

According to the results and methodology of this study, there was no difference in the synthesis of IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 in healthy individuals or in those with periodontal injuries. However, there was an increase in the cytokines IL-12, IL-15, and IL-18 one year after the implant was placed, which would be increasing the inflammatory activity in peri-

implantitis. Since this was the first study to correlate the cytokines IL-12, IL-15, IL-18, and IL-32 before placement of an implant and one year after it, in the volunteers of a control group and in those with injuries (gingivitis and/or periodontitis), more studies would be necessary to better understand the immunological balance in gingivitis, periodontitis, and peri-implantitis.

In summation, local factors, functional implants, and the time since the installation of the implant must be considered for future studies, so that base cytokine levels in the peri-implant crevicular fluid can be verified.

Declaration of human rights

All procedures carried out in studies involving human beings were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committees and with the 1964 Declaration of Helsinki and with its later amendments or with comparable ethical standards.

Acknowledgments

We would like to thank the professors and students from the Universidade de Uberaba who gave us support. To the coordinator of the Post-graduation Implantology Course, Alan Garcia Essado and to the Coordinator of the Dentistry course, and Luís Henrique Borges, professors at the Universidade de Uberaba (UNIUBE) for providing their authorization and help in the collection of samples from the Getúlio Vargas Polyclinic, in the Universidade de Uberaba (UNIUBE). We also thank Dr. Marcos Vinícius da Silva and Dr. Ana Carolina de Moraes Oliveira, for collaborating by performing the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), carried out in the immunology laboratory at the Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). This work was financed by the Post-graduation Program in Health Sciences from the Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); by the Post-graduation Program in Dentistry and the Scientific Initiation Program from the Universidade de Uberaba (PIBIC-UNIUBE-2019/004); by the Cefores/Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM); by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PQ-2018/Process No. 302867/2018-0), and by the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG). The funding sources were not involved in the design of the study, data collection, analysis, writing, nor in the decision to submit the paper for publication.

Declarations of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ali, M., Yang, F., Plachokova, A. S., Jansen, J. A., & Walboomers, X. F. (2021). Application of specialized pro-resolving mediators in periodontitis and peri-implantitis: a review. *European Journal of Oral Sciences*, 129(1). 10.1111/eos.12759
- Badolato, R; Ponzi, A.N.; Millesimo, M., Notarangelo, L. D., & Musso, T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood*. 1997;90(7):2804-2809. [https://0019-9567/98/\\$04.0010](https://0019-9567/98/$04.0010)
- Bannwart, C. F., Nakaira, E. T., Sartori, A., & Peraçoli, M. T. S. (2007). Interleukin-15: its role in microbial infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(3). 10.1590/s1678-91992007000300002
- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., & 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, S286–S291. 10.1111/jcpe.12957
- Buduneli, E., Genel, F., Atilla, G., & Küçükçüçler, N. (2003). Evaluation of p53, bcl-2, and Interleukin-15 Levels in Gingival Crevicular Fluid of Cyclosporin A-Treated Patients. *Journal of Periodontology*, 74(4), 506–511. 10.1902/jop.2003.74.4.506

- Carson, W., & Caligiuri, M. A. (1998). Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(1), 1–9. 10.1590/s0100-879x1998000100001
- Carson, W.E., Ross, M. E., Baiocchi, R. A., Marien, M.J., Boiani, N., Grabstein, K; Caligiuri, M. A. (1995). Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *The Journal of Clinical Investigation*. 96, 2578-82. 10.1172/JCI118321
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., & Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S68–S77. 10.1111/jcpe.12940
- Conti, P., Youinou, P., & Theoharides, T. C. (2007). Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). *Autoimmunity Reviews*, 6(3), 131–137. 10.1016/j.autrev.2006.08.015
- De Araújo, M. F., Etchebhere, R. M., de Melo, M. L. R., Beghini, M., Severino, V. O., de Castro Côbo, E., & de Lima Pereira, S. A. (2017). Analysis of CD15, CD57 and HIF-1 α in biopsies of patients with peri-implantitis. *Pathology - Research and Practice*, 213(9), 1097–1101. 10.1016/j.prp.2017.07.020
- De Mendonça, A. C., Santos, V. R., César-Neto, J. B., & Duarte, P. M. (2009). Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels After Surgical Anti-Infective Mechanical Therapy for Peri-Implantitis: A 12-Month Follow-Up. *Journal of Periodontology*, 80(4), 693–699. 10.1902/jop.2009.080521
- Escobar, G. F., Abdalla, D. R., Beghini, M., Gotti, V. B., Junior, V. R., Napimoga, M. H.; Ribeiro, B. M., Rodrigues, D. B. R.; Nogueira, R. D., & de Lima Pereira, S.A. (2018). Levels of Pro and Anti-inflammatory Cytokines and C-Reactive Protein in Patients with Chronic Periodontitis Submitted to Nonsurgical Periodontal Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(7), 1927-1933. 10.22034/APJCP.2018.19.7.1927
- Figueredo, C. M., Rescala, B., Teles, R. P., Teles, F. P., Fischer, R. G., Haffajee, A. D., & Gustafsson, A. (2008). Increased interleukin-18 in gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 173–176. 10.1111/j.1399-302x.2007.00408.x
- Goda, C., Kanaji, T., Kanaji, S., Tanaka, G., Arima, K., Ohno, S., & Izuhara, K. (2006). Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *International Immunology*, 18(2), 233–240. 10.1093/intimm/dxh339
- Gorvel, L., Korenfeld, D., Tung, T., & Klechevsky, E. (2017). Dendritic Cell-Derived IL-32 α : A Novel Inhibitory Cytokine of NK Cell Function. *The Journal of Immunology*, 199(4), 1290–1300. 10.4049/jimmunol.1601477
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). A Single-Step Method for the Simultaneous Preparation of DNA, RNA, and Protein from Cells and Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018(1), pdb.prot093500. 10.1101/pdb.prot093500
- Hu, Z., Wu, D., Zhao, Y., Chen, S., & Li, Y. (2019). Inflammatory cytokine profiles in the crevicular fluid around clinical healthy dental implants compared to the healthy contralateral side during the early stages of implant function. *Archives of Oral Biology*, 104509. 10.1016/j.archoralbio.2019.10
- Johnson, R. B., & Serio, F. G. (2005). Interleukin-18 Concentrations and the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 76(5), 785–790. 10.1902/jop.2005.76.5.785
- Kalsi A., Moreno, F., & Petridis, H. (2021). Biomarkers associated with periodontitis and peri-implantitis: a systematic review. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 51(1): 3–17. 10.5051/jpis.1902840142
- Kim, S.-H., Han, S.-Y., Azam, T., Yoon, D.-Y., & Dinarello, C. A. (2005). Interleukin-32. *Immunity*, 22(1), 131–142. 10.1016/j.immuni.2004.12.003
- 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. 10.3390/antibiotics9110835
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., & Okamura, H. (2001). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 423–474. 10.1146/annurev.immunol.19.1.
- Novick, D., Rubinstein, M., Azam, T., Rabinkov, A., Dinarello, C. A., & Kim, S.-H. (2006). Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3316–3321. 10.1073/pnas.0511206103
- Orozco, A., Gemmell, E., Bickel, M., & Seymour, G. J. (2006). Interleukin-1 beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4), 256–260. 10.1111/j.1399-302x.2006.00292.x
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., & Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S162–S170. 10.1111/jcpe.12946
- Pradeep, A. R., Daisy, H., Hadge, P., Garg, G., & Thorat, M. (2009). Correlation of Gingival Crevicular Fluid Interleukin-18 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels in Periodontal Health and Disease. *Journal of Periodontology*, 80(9), 1454–1461. 10.1902/jop.2009.090117
- 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. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S278–S285. 10.1111/jcpe.12956
- Rinke, S., Nordlohne, M., Leha, A., Renvert, S., Schmalz, G., & Ziebolz, D. (2020). Risk indicators for mucositis and peri-implantitis: results from a practice-based cross-sectional study. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 50(3), 183-196. 10.5051/jpis.2020.50.3.183
- Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M. M., Wagner, J. A., Jewell, B. A., Schappe, T., & Fehniger, T. A. (2016). Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Science Translational Medicine*, 8(357), 357ra123–357ra123. 10.1126/scitranslmed.aaf2341

- Sattler, A., Dang-Heine, C., Reinke, P., & Babel, N. (2015). IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. *European Journal of Immunology*, 45(8), 2286–2298. 10.1002/eji.201445313
- Schierano, G., Pejrone, G., Brusco, P., Trombetta, A., Martinasso, G., Preti, G., & Canuto, R. A. (2008). TNF- α TGF- β 2 and IL-1 β levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(6), 532–538. 10.1111/j.1600-051x.2008.01224.x
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Gatto, R., & Monaco, A. (2013). Periodontitis, implant loss and peri-implantitis. A meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 26(4), e8–e16. 10.1111/clr.12319
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., & Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–355. 10.1590/1678-775720140259
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S149–S161. 10.1111/jcpe.12945
- Ussher, J. E., Bilton, M., Attwod, E., Shadwell, J., Richardson, R., de Lara, C., & Willberg, C. B. (2013). CD161⁺⁺CD8⁺T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *European Journal of Immunology*, 44(1), 195–203. 10.1002/eji.201343509
- Yoshikai, Y., & Nishimura, H. (2000). The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes and Infection*, 2(4), 381–389. 10.1016/s1286-4579(00)00329-4
- Zhang, X., Wang, Q., Yan, X., Shan, Y., Xing, L., Li, M., & Lai, W. (2020). Immune landscape of periodontitis unveils alterations of infiltrating immunocytes and molecular networks-aggregating into an interactive web-tool for periodontitis related immune analysis and visualization. *Journal of Translational Medicine*, 18(1). 10.1186/s12967-020-02616-1
- Zhuang, L., Fulton, R. J., Rettman, P., Sayan, A. E., Coad, J., Al-Shamkhani, A., & Khakoo, S. I. (2018). Activity of IL-12/15/18 primed natural killer cells against hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 13, 75–83. 10.1007/s12072-018-9909-3