

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PROJETO DE PESQUISA

**Marcadores inflamatórios da saliva e do sulco gengival
de dentes que receberão coroa metalocerâmicas em
diferentes fases dos procedimentos clínicos
e a influência do sistema renina-angiotensina no
tratamento**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Pesquisadora: Isadora Prado Cano

Bauru

2020

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	4
OBJETIVOS	7
JUSTIFICATIVA	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	16
CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	17
RISCOS E BENEFÍCIOS.....	17
ORÇAMENTO	17
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

O objetivo de qualquer procedimento restaurador é restabelecer/manter a função, a estética, a fonética e a saúde dos tecidos periodontais. Em próteses fixas sobre dentes a cárie ainda é a principal causa de falhas biológicas, correspondendo aproximadamente a 32% dos casos, enquanto que a doença periodontal é responsável por apenas 4% destas falhas, juntamente com as endodônticas. O presente estudo tem como objetivo determinar se o bloqueio do sistema renina-angiotensina por drogas usadas pelos pacientes em reabilitação oral e se materiais utilizados durante o tratamento para a confecção de coroas metalocerâmicas influenciam qualitativa e quantitativamente a presença de citocinas relacionadas à inflamação gengival, metabolismo ósseo no sulco gengival, assim como a secreção salivar e marcadores inflamatórios nela presente. A amostra será constituída de 51 pacientes que necessitam restaurar pré-molares, com coroas totais metalocerâmicas. Serão divididos em 3 grupos (n=17), sendo o primeiro grupo de pacientes normotensos e sistemicamente saudáveis (controle) e os dois outros grupos (testes), compostos de pacientes hipertensos, sob tratamento com drogas antagonistas de receptores AT1 da Angiotensina II (como losartan e telmisartan) e drogas inibidoras da Enzima Conversora de Angiotensina (como captopril e enalapril). Os parâmetros avaliados serão: presença de citocinas pró e anti-inflamatórias no sulco gengival em diferentes fases dos procedimentos clínicos em: 1) 30 dias após raspagem coronal, 2) 2 dias e 3) 15 dias após a confecção das coroas provisórias, 4) 2 dias, 5) 15 dias e, 6) 6 meses após a cimentação das coroas metalocerâmicas. Também serão avaliados: profundidade de sondagem, nível de inserção clínica; recessão gengival; índice gengival; índice de placa e quantidade e espessura de mucosa ceratinizada. As dosagens das quantidades dos mediadores (pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e mediadores de resposta Th) serão registradas através de médias e desvios padrões e a normalidade dos dados será verificada através do método Kolmogorov-Smirnov. Todas avaliações serão também realizadas no pré-molar contralaterais que servirão como controle do próprio paciente. Serão coletadas duas amostras de saliva no primeiro dia de atendimento, sem intervenções realizadas, e serão avaliadas por mensuração do fluxo salivar estimulado e não estimulado, com dosagem de proteínas totais da saliva. Para a comparação entre os tempos, nas variáveis quantitativas será utilizado o teste "t" pareado e nas variáveis medidas em escore será utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Em todos os testes estatísticos será adotado nível de significância de 5%.

Palavras-chaves: citocinas; coroa metalocerâmica; periodonto; saliva; inflamação; sistema renina-angiotensina.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo de qualquer procedimento restaurador é restabelecer/manter a função, a estética, a fonética e a saúde periodontal. Segundo alguns autores, a complexidade e as inúmeras intervenções durante a execução dos procedimentos clínicos para a confecção de próteses fixas sobre dentes podem causar falhas nas próteses em períodos de médio e longo prazos (1-3). Essas falhas podem ser divididas em mecânicas e biológicas, sendo que a cárie é a principal causa de falha biológica, correspondendo a aproximadamente 32% dos casos (3,4). A doença periodontal é responsável por apenas 4%, juntamente com as falhas endodônticas (3). Dentes pilares com tratamento endodôntico ou perda de inserção óssea apresentam altas taxas de sobrevivência, variando de 83 a 98% (5-7).

A condição periodontal ideal para a reabilitação protética baseia-se na ausência de inflamação, presença de mucosa ceratinizada e ausência de bolsa periodontal. A longevidade da prótese irá depender, além da qualidade do trabalho realizado, de programas regulares de manutenção principalmente para indivíduos com alto risco à carie e doença periodontal em próteses sobre dentes (8,9).

O desrespeito aos tecidos periodontais durante os procedimentos clínicos, como localização do término cervical com uma distância mínima de 3 mm da margem óssea, adaptação inadequada da margem da coroa, porosidade superficial dos materiais restauradores, controle inadequado de placa bacteriana pelo paciente (5) e excesso de cimento em volta da coroa, podem desencadear um processo inflamatório (10). Como resultado desse processo inflamatório poderá ocorrer formação de bolsa periodontal ou recessão gengival, dependendo do biótipo gengival (11).

Além desses aspectos, há de se considerar o estado geral de saúde do indivíduo, visto que algumas doenças sistêmicas, como a hipertensão, também podem alterar o comportamento biológico/reparador do periodonto de proteção e sustentação. A hipertensão é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares e tem sido relacionada com alterações, tais como perda óssea gradual e uma diminuição no índice de massa óssea. Os mecanismos celulares

e moleculares que envolvem hipertensão e inflamação não são totalmente compreendidos. Muitos pacientes que têm pressão arterial elevada, controlada ou não, fazem uso de pelo menos um medicamento anti-hipertensivo (12). Portanto, é muito importante compreender a interferência da hipertensão nos mecanismos inflamatórios e de reparo que acontecem no sulco gengival de pacientes que recebem tratamento reabilitador com próteses fixas sobre dente.

Em modelos experimentais animais com periodontite (13) e artrite (14), há indícios de que drogas anti-hipertensivas que são antagonistas de receptores da Angiotensina II, como losartan e telmisartan, tem poderoso efeito anti-inflamatório pela diminuição da expressão de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e redução da perda óssea. Gealh et al (12) mostraram que o uso de losartan em ratos espontaneamente hipertensos melhorou o processo de reparo e cicatrização óssea.

Análise de tecido gengival humano mostrou que a gengivite altera a atividade da ECA (15) quando comparada com amostras de gengiva saudável, desta forma sugere-se que diferentes vias do sistema renina-angiotensina estejam relacionadas ao metabolismo do tecido periodontal.

Os processos inflamatórios e imunes que se desenvolvem nos tecidos periodontais decorrentes de injúrias mecânicas ou biológicas são protetores em intenção, mas também resultam em danos teciduais causados pela produção de mediadores inflamatórios e enzimas destrutivas. Estes podem ser divididos em citocinas, prostanoídes e metaloproteinases de matriz (16). As citocinas desempenham um papel fundamental na inflamação. São proteínas solúveis produzidas por um grande número de tipos celulares, incluindo células do infiltrado inflamatório, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e também por células residentes no periodonto, incluindo fibroblastos. As citocinas sinalizam, transmitem e amplificam a resposta imune e são importantes na regulação das respostas imunoinflamatórias e na luta contra infecções. Como efeitos adversos de sua produção podem ocorrer destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar, por meio da indução de fibroblastos e osteoclastos.

As interleucinas 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) são citocinas multifuncionais envolvidas na regulação das repostas imune e inflamatória. A interleucina 1 β (IL-1 β) e o TNF- α são citocinas pró-

inflamatórias associadas à reabsorção óssea, assim como a interleucina6 (IL-6). A IL-4 também é uma citocina pró-inflamatória encontrada em níveis elevados no fluido gengival de indivíduos saudáveis. Já a interleucina8 (IL-8) é uma citocina quimiotática que atua no recrutamento de células de defesa para áreas onde estas são necessárias (17). Outra citocina pro-inflamatória com importante papel na indução e modulação das respostas imune e inflamatória é a MIP-1 α (Proteína Inflamatória para Macrófago) (18). Células epiteliais do tecido gengival inflamado são capazes de secretar essa quimiocina, promovendo o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) nas fases iniciais da doença. Esses mesmos leucócitos podem ser estimulados por LPS bacteriano e outras citocinas, como IL-1 β , a expressar mais quantidades de MIP-1 α , recrutando e retraindo PMN no sulco gengival (19).

Um dos principais estimuladores da formação de novos vasos sanguíneos é o VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial) que é produzido por osteoblastos, osteoclastos, células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos gengivais e também do ligamento periodontal. O VEGF induz a angiogênese por meio da formação de estruturas tubulares e proliferação de células endoteliais linfáticas, através de receptores específicos, desempenhando um papel essencial na reparação e regeneração tecidual (20,21).

O fluido gengival consiste num transudado de fluido intersticial do tecido gengival e pode ser coletado no sulco gengival ao redor dos dentes (22). A identificação de marcadores no fluido gengival tornou-se importante para o diagnóstico e tratamento das alterações nos tecidos periodontais. A análise dos constituintes do fluido fornece um indicador bioquímico quantitativo do metabolismo celular local que reflete o estado de saúde dos tecidos periodontais de um indivíduo (23).

Também colaboradora com a manutenção dos tecidos orais, a saliva exerce efeitos de limpeza, tamponamento, proteção, facilitação de funções fonéticas, mastigatórias e o uso de próteses removíveis. Na prática clínica, o cirurgião que se depara com a hipossalivação e/ou xerostomia enfrenta desafios no seu tratamento e, portanto, deve saber identificar a normalidade e as possíveis causas de sua alteração. Radioterapia, doenças sistêmicas, estresse crônico e alterações medicamentosas podem ser responsáveis pela alteração do fluxo salivar (24).

Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, em ratos, sugere que a inibição do receptor AT1 para angiotensina II também pode causar redução deste fluido protetor (25). Além disso, acompanhando pacientes hospitalizados que tomavam inibidores da ECA, Mangrella et al. (26) observaram que 8% dos pacientes estudados se queixavam de boca seca. Contudo, o real impacto que o bloqueio do sistema renina-angiotensina pode causar na salivação ainda é controverso em estudos com outros tipos de pacientes (27).

Poucos estudos abrangem uma comparação entre populações maiores e mais generalizadas, considerando não somente o gênero da amostra mas também as diferentes idades e tratamentos (28). O questionamento do nosso grupo de pesquisa é em relação às análises qualitativas e quantitativas do fluxo salivar considerando possíveis alterações pelo uso de anti-hipertensivos assim como a presença de restaurações protéticas no ambiente intraoral.

OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral determinar como os procedimentos clínicos e se o uso de coroas metalocerâmicas afeta o periodonto diferentemente de dentes sem reabilitação. Ademais, objetiva-se determinar se o uso de drogas antagonistas do receptor AT-1 ou o uso de drogas inibidoras da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) por pacientes em reabilitação oral com coroas unitárias metalocerâmicas influencia a produção local de mediadores relacionados à inflamação gengival e metabolismo ósseo no sulco gengival assim como influenciaria quantitativa e qualitativamente a secreção salivar.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar a presença de inflamação, por meio da produção de citocinas no sulco gengival previamente ao início dos procedimentos clínicos de preparo dental, 30 dias após a raspagem corono-radicular, 2 dias e 15 dias após a confecção e cimentação das coroas provisórias, 2 dias, 15 dias e 6 meses após a cimentação da coroa metalocerâmica nos 3 grupos de pacientes avaliados neste estudo;

2. Avaliar se há alteração nos parâmetros clínicos periodontais, como profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, recessão gengival, índice

gengival, índice de placa, quantidade e espessura de mucosa ceratinizada nos diversos períodos da reabilitação protética nos 3 grupos de pacientes avaliados neste estudo.

4. Avaliar quantitativa e qualitativamente se e como os tratamentos farmacológicos com anti-hipertensivos têm afetado o fluxo salivar estimulado e não estimulado, dos pacientes a serem reabilitados.

A hipótese nula testada neste estudo é que, durante o tratamento para confecção de coroas metalocerâmicas, o uso de drogas antagonistas do receptor AT-1 e inibidoras da ECA não influencia a produção local de mediadores relacionados à inflamação gengival e metabolismo ósseo no sulco gengival, quando comparado ao dente natural contralateral e ao grupo controle. Quanto à salivação, a hipótese nula é que pacientes hipertensos tratados com drogas antagonistas do receptor AT-1 ou drogas inibidoras da ECA não têm diferença nas mensurações de fluxo salivar estimulado e não-estimulado.

JUSTIFICATIVA

É comum observar em pacientes que recebem tratamentos com próteses fixas sobre dentes que o tecido gengival marginal pode sofrer alterações no decorrer e após a finalização do tratamento, com um impacto negativo na função e estética. Nesses casos, após algum tempo da cimentação definitiva da coroa tem-se recessão gengival decorrente, provavelmente, da diminuição/eliminação do processo inflamatório. Entretanto, em alguns pacientes com biótipos gengivais semelhantes que passam pelo mesmo tipo de tratamento, realizado pelo mesmo operador e sob condições muito semelhantes, percebe-se também a não ocorrência destes fatos. Poderia a presença da espessura mínima do cimento definitivo ou provisório, mesmo após a remoção dos excessos, que permanece em contato com o epitélio sulcular causar inflamação em níveis desconhecidos e relacionados às variáveis deste estudo (uso de medicamento, biótipo) resultar em tais condições? Poderiam os procedimentos clínicos relacionados com o preparo subgengival, reembasamento cervical de coroas provisórias e/ou moldagem, que requerem retração do tecido marginal, causar inflamação gengival em magnitude que possa ser correlacionada à retração

gingival pós-tratamento? A alteração do comportamento biológico/reparador do periodonto de proteção e sustentação pode ter relação com o uso de drogas anti-hipertensivas comumente usadas por pacientes em tratamento reabilitador oral como losartan/telmisartan ou captopril/enalapril? A salivagem dos grupos estudados seria diferente e poderia influenciar no reparo intraoral? Tais questionamentos não parecem ter sido alvo de investigação na literatura pertinente.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Aspectos éticos

A pesquisa será iniciada após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

2. Delineamento do estudo

Será um estudo clínico prospectivo com acompanhamento de 6 meses após a cimentação das coroas metalocerâmicas em dentes pré-molares humanos.

3. Amostra

3.1. População alvo e cálculo amostral

A amostra será constituída de 51 pacientes que necessitam restaurar dentes pré-molares com coroas totais metalocerâmicas. O grupo controle será constituído de pacientes sistemicamente saudáveis (n=17) e os grupos experimentais serão compostos por pacientes hipertensos usuários de drogas antagonistas de receptores AT1 (ex: losartan e telmisartan, n =17) e pacientes hipertensos usuários de drogas inibidoras da ECA (ex: captopril e enalapril, n=17). O cálculo amostral foi baseado nos valores em pg/mL da expressão de TNF- α no trabalho de Passarielo et al. (29), assumindo um desvio padrão de 2 pg/mL, α = 5% e força de 80%. Vale destacar que este trabalho é o que mais se aproxima da proposta do presente estudo. Os pacientes serão selecionados e

atendidos na clínica de pós-graduação da FOB/USP e deverão obedecer aos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

-Critérios de Inclusão: os pacientes não deverão apresentar nenhum tipo de periodontite (ex. agressiva, crônica, necrosante); devem ter entre 30 e 60 anos, sem distinção de gênero ou raça; devem apresentar pré-molares com indicações de restaurações com coroas metalocerâmicas, independentemente de apresentarem vitalidade pulpar ou não; os dentes adjacentes aos dentes que receberão as coroas deverão apresentar as seguintes características: profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm, não apresentarem sangramento à sondagem e perda de inserção; presença de pré-molares contralaterais naturais. Para inclusão dos pacientes nos grupos experimentais (sob tratamento com antagonistas do receptor AT1 ou inibidores da ECA), o tratamento deve ter sido iniciado há pelo menos 6 meses.

-Critérios de exclusão: presença de periodontites; diabetes mellitus; fumantes; gestantes e lactantes (30); alergia ao iodo; estar realizando tratamento ortodôntico; usuários de imunossupressores, anticonvulsivantes, antibióticos, anti-inflamatórios ou usuários de outras classes de drogas anti-hipertensivas, como bloqueadores de canais de cálcio (30) e betabloqueadores.

4. Avaliação periodontal

4.1. Avaliação periodontal inicial

Todos pacientes selecionados serão avaliados por um profissional especializado nos seguintes aspectos: medida da profundidade de sondagem: medida da margem gengival a base do sulco gengival, com sonda periodontal milimetrada PCPUNC15 (Hu-Friedy®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual);

-Determinação do índice de sangramento gengival: será feita avaliação dicotômica do sangramento gengival ocorrido dentro de 10 segundos após a sondagem nos sítios disto-vestibular, vestibular, mésio-vestibular, disto-lingual, lingual e disto-lingual, atribuindo-se escore 0 para a ausência de sangramento e escore 1 para sua presença (31).

- Determinação do índice de placa: será feita avaliação dicotômica da presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa bacteriana após evidenciação com verde de malaquita 1% (31).

- Instrução de técnica de higiene oral: Nos pacientes selecionados será realizada raspagem e alisamento radicular com curetas de Gracey e polimento com pasta profilática e receberão instruções e treinamento de técnica de higiene oral.

Todas as avaliações serão também realizadas nos pré-molares contralaterais que servirão como controle do próprio paciente.

Para avaliar as alterações dos parâmetros clínicos em todas as fases, em cada paciente será confeccionado um guia oclusal (32) que servirá de orientação para a realização das diferentes medidas que serão descritas posteriormente. Para isso será feita moldagem de toda a arcada dentária com hidrocolóide irreversível Jeltrate®, (Dentsply Ind. Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Após a obtenção do modelo em gesso pedra, um guia oclusal será confeccionado em resina acrílica ativada quimicamente (Jet Clássico®, Artigos Odontológicos Clássicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), estendendo-se para os dentes mesial e distal ao dente que irá receber a cora total. O guia deverá ter sua superfície oclusal plana e deverá ter sulcos verticais presentes na face vestibular, confeccionados com ponta diamantada cilíndrica nº 1090 KG-Sorensen® para contra-ângulo, na direção ocluso-apical e em seis sítios. O guia será ajustado intrabucalmente para confirmar a localização dos pontos de referência. Esses pontos serão utilizados como guias para localização e angulação da sonda periodontal durante as medições e a superfície oclusal da placa servirá como *stop* para um cursor endodôntico. Após cada avaliação clínica a placa oclusal será acondicionada em pote plástico individual, identificado e preenchido com água e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo estabilizado (Virex® plus 2%, Ceras Johnson Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para manter a estabilidade da resina acrílica e impedir o crescimento de culturas de microrganismos.

As seguintes medidas clínicas serão obtidas com auxílio do guia oclusal e de sonda periodontal milimetrada PCPUNC (Hu-Friedy®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com cursor endodôntico Angelus® (Odonto-Lógica, Londrina, PR, Brasil) (32):

- Margem gengival (MG) – distância da superfície oclusal da placa até margem gengival dos sítios M, V, L e D;
- Nível de inserção relativo (NIR) - distância da superfície oclusal da placa até fundo do sulco gengival clínico nos sítios M, V, L, D;
- Junção mucogengival (JMG) – distância da superfície oclusal da placa até a JMG vestibular demarcada após aplicação de solução de Schiller (Lang e Loe, 1972).
- Profundidade de sondagem (PS) – subtração da medida de NIR e MG, nos sítios M, V, L e D.
- Mucosa ceratinizada (MC) - subtração da medida de JMG e MG do sítio V
- Espessura gengival (EG) - medida realizada com uma agulha gengival anestésica introduzida perpendicularmente no nível da profundidade de sondagem vestibular até tocar a superfície dentária de cada pré-molar. Um valor $\leq 1,5\text{mm}$ foi considerado como gengiva espessa e $> 1,5\text{mm}$, como gengiva fina (33).

As medidas obtidas com a sonda periodontal com o cursor endodôntico serão mensuradas com um paquímetro digital Mitutoyo (Digimess Instrumento de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com acurácia de centésimo de

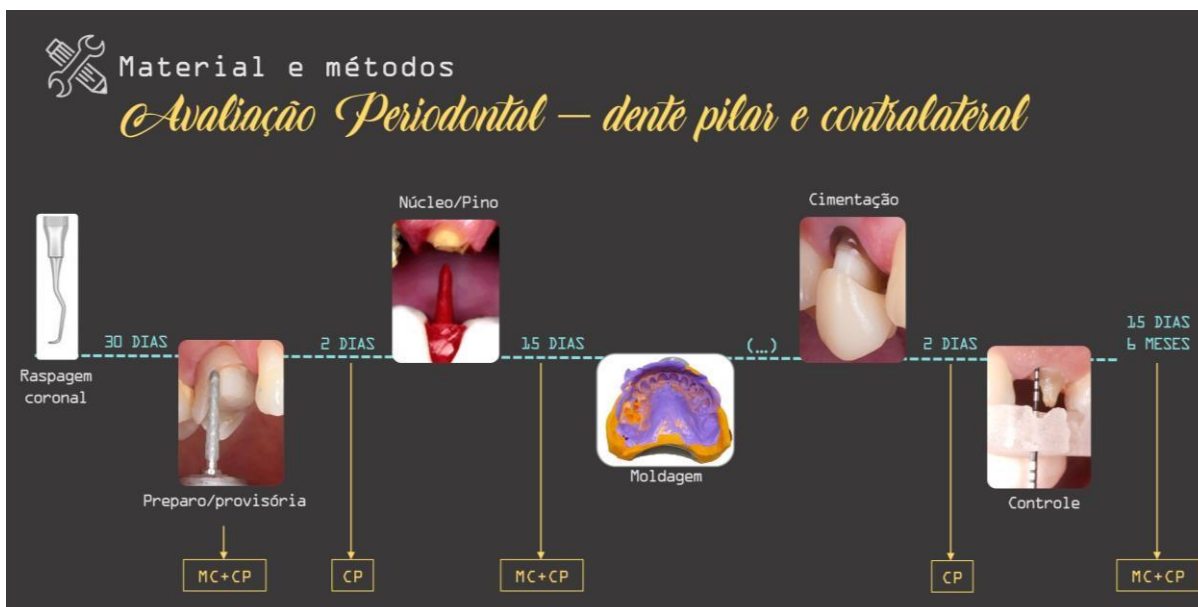


Figura 1: Linha do tempo das medidas realizadas na pesquisa. MC = medidas clínicas, realizadas com sonda periodontal e análise de espessura gengival; CP: coleta periodontal do fluido crevicular, realizada com cone de papel endodôntico. MC = 4 repetições; CP = 6 repetições.

milímetros. A média entre duas medições será considerada, minimizando o erro

inerente ao método. Todas as medidas clínicas serão obtidas nos seguintes períodos: 1) 30 dias após raspagem coronal, 2) 15 dias após a confecção das coroas provisórias, 3) 15 dias e, 4) 6 meses após a cimentação das coroas metalocerâmicas (esquema representado na figura 1).

4.2. Coleta do fluido crevicular

A coleta do fluido crevicular será feita antes das medidas clínicas em todos os momentos supracitados e, além destes, outras duas coletas serão realizadas: 2 dias após a cimentação da coroa provisória e 2 dias após a cimentação da coroa definitiva (Figura 1). Esta coleta será realizada na face vestibular do dente em questão e nos contralaterais em todos os períodos de avaliação com tiras de filtro de papel absorvente (Periopaper, Oralflow®). A tira de papel será inserida no sulco gengival, justaposta ao dente, até que uma leve resistência seja sentida e mantida em posição no local por 30 segundos. As amostras visualmente contaminadas com sangue ou saliva durante a coleta serão descartadas. Os filtros de papel absorvente contendo as amostras coletadas de fluido do sulco gengival serão colocados em tubos estéreis e armazenados a -80°C (34). Antes da realização do método de Bradford e com o objetivo de diluir o conteúdo de fluido do sulco gengival, um volume de 250 µl de solução tampão (PBS 1x) será adicionado a cada tubo, os quais serão agitados por 30 segundos e, posteriormente, centrifugados a 2000 g, a uma temperatura de 4°C, durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante será pipetado e aliquoteado em tubos estéreis (35).

4.3. Dosagem e leituras de proteínas totais

Será realizada nas amostras coletadas do fluido gengival empregando-se o método de Bradford (36) para padronização da quantidade proteica. Previamente à realização dos testes ELISA, por meio de kit comercial, utilizando-se como padrão a curva da albumina diluída em água destilada, para cada 200 µL de amostra serão adicionados 50 µL do reagente Comassie Blue. Após incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, as leituras serão realizadas em espectrofotômetro (Synergy™ MxMonochromator-BasedMulti-ModeMicroplate Reader. BioTekInstruments, Inc.; Winooski, VT, EUA), ajustado para o comprimento de onda de 450 nm.

4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Será feita a medição dos seguintes mediadores inflamatórios solúveis, estudadas no fluido gengival pelos respectivos autores abaixo listados:

Mediadores pró-inflamatórios:

- IL-1 α e β (23,34,37-39);
- IL-6 (23,37,39-41);
- IL-8 (23,37-40).
- TNF- α (23,39,41);
- CCL-3 ou MIP-1 (37);
- CCL-5 (37);
- VEGF (39);

Mediadores anti-inflamatórios:

- IL-10 (39);
- TGF- β (35,39);
- CXCL12 ou SDF-1 α (42);

Mediadores de resposta Th:

- IL-4 (37,39);
- IL-17 (41);
- IFN- γ (37,39).

A quantificação será feita a partir das alíquotas de cada amostra de fluido do sulco gengival por ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo as instruções do fabricante. De forma sucinta, a quantificação dos analitos com tecnologia multiplex será realizada utilizando-se "beads" magnéticas fluorescentes acopladas aos anticorpos específicos para cada alvo estudado em uma mesma placa. A placa pré-desenhada com o painel de citocinas (HCYTOMAG-60K | MILLIPLEX) será lida em um aparelho LuminexMagpix (Millipore – adquirido por docente da FOB/USP, via processo FAPESP 2012/15133-3), e os resultados

serão analisados no software do mesmo equipamento, sendo expressos em pg/mL de proteína.

5. Confecção das coroas.

Todos os procedimentos técnicos e materiais empregados na confecção e cimentação de coroas metalocerâmicas seguirão os princípios descritos por Pegoraro (7).

Todos os materiais empregados nesses procedimentos serão padronizados e executados por um profissional experiente. Para a cimentação provisória e definitiva das coroas metalocerâmicas serão utilizados os cimentos Temp Bond NE (Kerr, USA) e Ketac Cem (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), respectivamente.

5. Coleta de saliva

No primeiro dia de atendimento, em que serão feitas raspagem, profilaxia e assinatura do TCLE, também será solicitado que o paciente deposite uma amostra de saliva em um tubo de polipropileno. Antes de qualquer mensuração salivar, o paciente deverá descansar na cadeira, sem fazer esforço físico, por 10 minutos. A coleta será do fluxo salivar não-estimulado (FSNE) e, em seguida, do fluxo salivar estimulado (FSE) pela mastigação de um hiperboloide (Halitus®, Campinas, São Paulo, Brasil). Os horários desta coleta serão registrados, visto que o nosso objetivo também é constatar se a quantidade de proteínas totais na saliva e os marcadores inflamatórios sofrem alteração de concentração durante o dia assim como acontece com o cortisol.

Segundo Flink et al. (28) e Giafferis et al. (24), o fluxo salivar não-estimulado deve ser coletado numa posição relaxada, ligeiramente inclinando a cabeça para frente. Após engolir, o paciente deve depositar a saliva passivamente por 5 minutos em um tubo de coleta.

O fluxo salivar estimulado é mensurado logo em seguida, e pede-se aos participantes para mastigar um pedaço de parafina macio. Após engolir, a saliva estimulada será coletada em um tubo de centrifuga por 3 minutos.

A padronização dos resultados será comparada com os parâmetros de Flink et al. (28) como indicado no quadro 1.

Ambos os fluxos serão pipetados para registro preciso da quantidade de secreção salivar, e uma amostra do FSE será congelada a -80°C para mensuração de proteínas totais pelo método de Bradford. Na saliva, também serão feitas as mesmas análises dos marcadores citados no item 4.4.

Salivação em Repouso (mL/min)	Salivação Estimulada (mL/min)	Interpretação
> 0,2	> 1,0	Normal
0,1-0,19	0,7-0,99	Baixo Fluxo
<0,1	<0,7	Hipossalivação

Quadro 1: Parâmetros para avaliação do fluxo salivar

Fonte: Flink et al. (2008).

FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Análise estatística

Serão elaboradas tabelas e gráficos com os valores encontrados para todas as variáveis estudadas, bem como para os testes estatísticos realizados. Serão analisadas as diferenças das alterações entre os períodos experimentais.

As dosagens das quantidades dos mediadores serão registradas por meio de média e desvio-padrão e, em seguida, a normalidade dos dados será verificada por intermédio do método Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis medidas em escore serão empregadas a média, a mediana, o 1º quartil e o 3º quartil.

Para a comparação entre os tempos, nas variáveis quantitativas será utilizado o teste t pareado e nas variáveis medidas em escore será utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Em todos os testes estatísticos será adotado nível de significância de 5% (valores de $p < 0,05$ serão considerados como indicativo de significância).

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Cronograma

Descrição das atividades	2020/2021				2022	
	02-03	03-12	01-06	10-12	01-03	03-06
Atualização bibliográfica						
Atualização do projeto na Plataforma Brasil						
Seleção da amostra e preparo inicial						
Coleta das amostras do fluido gengival						
Coleta das amostras de saliva						
Análise das amostras coletadas						
Análise estatística dos resultados e redação dos artigos científicos.						

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos desta pesquisa são dor, desconforto e sangramento durante a sondagem; eventualmente, cansaço no momento do exame e cansaço muscular pela estimulação quando for mastigar o hiperbolóide na coleta da saliva.

Os benefícios desta pesquisa são controles frequentes da pressão arterial e de inflamação da gengiva que acarretarão na motivação ao autocuidado e à higiene e implicará em maior tempo de permanência da coroa na boca.

ORÇAMENTO

Material necessário	Valor (R\$)
Kit para detecção/quantificação de citocinas	10.000,00
Tiras de filtro de papel absorvente (Periopaper, Oraflow)	190,00
Material de impressão e documentação	50,00
Material de consumo odontológico	2.000,00

TOTAL: R\$ 12.240,00

O kit para detecção/quantificação de citocinas, as tiras de filtro de papel absorvente (Periopaper, Oraflow®) e o material de consumo odontológico para o tratamento serão custeadas pelo projeto de pesquisa Temático da FAPESP 2015/03965-2, o qual está vinculado a este trabalho.

O material de impressão e documentação terão financiamento próprio.

O custo laboratorial para confecção das próteses será arcado pelo paciente. Ele estará previamente ciente disto, como acordado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo de sua livre escolha o lugar desta confecção e sua relação contratual com a empresa.

REFERÊNCIAS

1. Miyamoto T, Morgano SM, Kumagai T, Jones JA, Nunn ME. Treatment history of teeth in relation to the longevity of the teeth and their restorations: outcomes of teeth treated and maintained for 15 years. *J Prosthet Dent* [Internet]. 2007 Mar;97(3):150-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17394913>
2. Pjetursson BE, Brägger U, Lang NP, Zwahlen M. Comparison of survival and complication rates of tooth-supported fixed dental prostheses (FDPs) and implant-supported FDPs and single crowns (SCs). *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2007 Jun;18 Suppl 3:97-113. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17594374>
3. De Backer H, Van Maele G, De Moor N, Van den Berghe L. An up to 20-year retrospective study of 4-unit fixed dental prostheses for the replacement of 2 missing adjacent teeth. *Int J Prosthodont* [Internet]. 2008;21(3):259-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548967>
4. Nääpänkangas R, Salonen-Kemppi MAM, Raustia AM. Longevity of fixed metal ceramic bridge prostheses: a clinical follow-up study. *J Oral Rehabil* [Internet]. 2002 Feb;29(2):140-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856392>
5. Brägger U, Aeschlimann S, Bürgin W, Hämmerle CH, Lang NP. Biological and technical complications and failures with fixed partial dentures (FPD) on implants and teeth after four to five years of function. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2001 Feb;12(1):26-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168268>
6. Moghaddam AS, Radafshar G, Taramsari M, Darabi F. Long-term survival rate of teeth receiving multidisciplinary endodontic, periodontal and

- prosthodontic treatments. J Oral Rehabil [Internet]. 2014 Mar;41(3):236-42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24483819>
7. Pegoraro LF. Prótese fixa: Bases para o planejamento em reabilitação oral. Artes Médi. São Paulo: Artes Médicas; 2013. 488 p.
 8. Donos N, Laurell L, Mardas N. Hierarchical decisions on teeth vs. implants in the periodontitis-susceptible patient: the modern dilemma. Periodontol 2000 [Internet]. 2012 Jun;59(1):89-110. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0757.2011.00433.x>
 9. Graetz C, Schwendicke F, Kahl M, Dörfer CE, Sälzer S, Springer C, et al. Prosthetic rehabilitation of patients with history of moderate to severe periodontitis: a long-term evaluation. J Clin Periodontol [Internet]. 2013 Aug;40(8):799-806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23758333>
 10. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. Ann Periodontol [Internet]. 1999 Dec;4(1):7-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863371>
 11. Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomlöf L. Proximal restorations and periodontal status. J Clin Periodontol [Internet]. 1994 Oct;21(9):577-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7806672>
 12. Gealh WC, Pereira CCS, Luvizuto ER, Garcia-Júnior IR, Antoniali C, Okamoto R. Healing Process of Autogenous Bone Graft in Spontaneously Hypertensive Rats Treated With Losartan: An Immunohistochemical and Histomorphometric Study. J Oral Maxillofac Surg [Internet]. 2014 Dec;72(12):2569-81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278239114011665>
 13. Araújo AA, Souza TO, Moura LM, Brito GAC, Aragão KS, Araújo LS, et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. J Clin Periodontol [Internet]. 2013 Dec;40(12):1104-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118063>
 14. Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Barroso LC, Queiroz-Junior CM, Costa V V, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. Peptides [Internet]. 2013 Aug;46:53-63. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727291>
15. Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. PLoS One [Internet]. 2015;10(8):e0134601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26244896>
 16. Carranza FA, Newman MG, Takei HH. Periodontia Clínica. Elsevier; 2012.
 17. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. Dev Comp Immunol [Internet]. 2004 May 3;28(5):443-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062643>
 18. Morandini ACF, Sipert CR, Gasparoto TH, Greggi SLA, Passanezi E, Rezende MLR, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1 α , stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. J Periodontol [Internet]. 2010 Feb;81(2):310-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151811>
 19. Ryu OH, Choi SJ, Linares AMG, Song IS, Kim YJ, Jang KT, et al. Gingival Epithelial Cell Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α Induced by Interleukin-1 β and Lipopolysaccharide. J Periodontol [Internet]. 2007 Aug;78(8):1627-34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29539188>
 20. Nishi H, Ohta K, Takechi M, Yoneda S, Hiraoka M, Kamata N. Wound healing effects of gingival fibroblasts cultured in animal-free medium. Oral Dis [Internet]. 2010 Jul;16(5):438-44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233319>
 21. Agis H, Watzek G, Gruber R. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor by periodontal fibroblasts. J Periodontal Res [Internet]. 2012 Apr;47(2):165-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21954882>
 22. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2007 Mar;1098:216-29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435131>
 23. Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD,

- Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000* [Internet]. 2003;31:167-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657001>
24. Giafferis RBL, Soares Junior LA, Santos PS da S, Chicrala GM. Estratégias Terapêuticas Disponíveis Para Xerostomia E Hipossalivação Em Pacientes Irrradiados De Cabeça E Pescoço: Manual Para Profissionais Da Saúde. *Rev Uningá*. 2017;54(1):45-58.
 25. Cano IP, Dionísio TJ, Cestari TM, Calvo AM, Colombini-Ishikiriama BL, Faria FC, et al. Losartan and isoproterenol promote alterations in the local renin-angiotensin system of rat salivary glands. *PLoS One*. 2019;ahead of p.
 26. Mangrella M, Motola G, Russo F, Mazzeo F, Giassa T, Falcone G, et al. [Hospital intensive monitoring of adverse reactions of ACE inhibitors]. *Minerva Med* [Internet]. 1998 Apr;89(4):91-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9676174>
 27. Masajtis-Zagajewska A, Nowicki M. Influence of Dual Blockade of the Renin-Angiotensin System on Thirst in Hemodialysis Patients. *Nephron Clin Pract* [Internet]. 2009;112(4):c242-7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/224790>
 28. Flink H, Bergdahl M, Tegelberg Å, Rosenblad A, Lagerlöf F. Prevalence of hyposalivation in relation to general health, body mass index and remaining teeth in different age groups of adults. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2008;36(6):523-31.
 29. Passariello C, Puttini M, Virga A, Gigola P. Microbiological and host factors are involved in promoting the periodontal failure of metaloceramic crowns. *Clin Oral Investig*. 2012;16(3):987-95.
 30. Müller HP, Schaller N, Eger T, Heinecke A. Thickness of masticatory mucosa. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2000 Jun;27(6):431-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10883873>
 31. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* [Internet]. 1975 Dec;25(4):229-35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1058834>
 32. Gonzalez MKS. Avaliação longitudinal, clínica e radiográfica, do processo de reparo dos tecidos periodontais marginais após cirurgia ressectiva de

- aumento de coroa [Internet]. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2006. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25135/tde-21062007-092515/publico/MarlyGonzalez.pdf>
33. Claffey N, Shanley D. Relationship of gingival thickness and bleeding to loss of probing attachment in shallow sites following nonsurgical periodontal therapy. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1986 Aug;13(7):654-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3531244>
 34. Shimada Y, Tabeta K, Sugita N, Yoshie H. Profiling biomarkers in gingival crevicular fluid using multiplex bead immunoassay. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013 Jun;58(6):724-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395670>
 35. Souza SLS, Andrade PF, Silva JS, Tristão FSM, Rocha FA, Palioto DB, et al. Effects of antimicrobial photodynamic therapy on transforming growth factor- β 1 levels in the gingival crevicular fluid. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2013 Feb;31(2):65-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23373793>
 36. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May 7;72:248-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
 37. Tymkiw KD, Thunell DH, Johnson GK, Joly S, Burnell KK, Cavanaugh JE, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2011 Mar;38(3):219-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198766>
 38. Chang K-CJ, Wheeler MA, Cabanilla Jacobs L, Litonjua LA. Interleukins in gingival crevicular fluid in patients with definitive full-coverage restorations. *Compend Contin Educ Dent* [Internet]. 2014 Apr;35(4):e18-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24773224>
 39. Nogueira-Filho G, Pesun I, Isaak-Ploegman C, Wijegunasinghe M, Wierzbicki T, McCulloch CA. Longitudinal comparison of cytokines in peri-implant fluid and gingival crevicular fluid in healthy mouths. *J Periodontol* [Internet]. 2014 Nov;85(11):1582-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24835419>

40. Yu L, Su J, Zou D, Mariano Z. The concentrations of IL-8 and IL-6 in gingival crevicular fluid during nickel-chromium alloy porcelain crown restoration. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2013 Jul;24(7):1717-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564008>
41. Madureira DF, da Silva JM, Teixeira AL, Abreu MHNG, Pretti H, Lages EMB, et al. Cytokine measurements in gingival crevicular fluid and periodontal ligament: Are they correlated? *Am J Orthod Dentofacial Orthop* [Internet]. 2015 Aug;148(2):293-301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26232838>
42. Havens AM, Chiu E, Taba M, Wang J, Shiozawa Y, Jung Y, et al. Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. *J Periodontol* [Internet]. 2008 May;79(5):845-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454663>
43. Aboodi GM, Sima C, Moffa EB, Crosara KTB, Xiao Y, Siqueira WL, et al. Salivary Cytoprotective Proteins in Inflammation and Resolution during Experimental Gingivitis—A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;5(January):1-12.