



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Maria Isabela Guimarães Campos
Cirurgiã-Dentista

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE A PERDA
PRECOCE DE IMPLANTES DENTAIS ENDÓSSEOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental - Área de concentração Histologia e Embriologia.

Piracicaba
2003



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Maria Isabela Guimarães Campos

Cirurgiã-Dentista

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE A PERDA
PRECOCE DE IMPLANTES DENTAIS ENDÓSSEOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental - Área de concentração Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Suplente:

Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior

Piracicaba
2003

Ficha Catalográfica

C157i Campos, Maria Isabela Guimarães.
Influência de polimorfismos genéticos sobre a perda precoce de implantes dentais endósseos. / Maria Isabela Guimarães Campos. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
xx, 110p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Interleucina. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem a fé no Senhor nada disso seria possível.

Aos meus pais, Isabel e Humberto, que estão sempre me apoiando incondicionalmente e fazendo de tudo para que eu realize meus sonhos.

À minha irmã, Isamara, pelo incentivo e carinho mesmo distante.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Line, pela acolhida nesta Instituição e por me mostrar que a melhor orientação é aquela baseada na confiança e independência.

AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP*, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. *Thales da Rocha Mattos Filho*, pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. *Lourenço Correr Sobrinho*, Coordenador Geral dos Programas de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. *Silvana Pereira Barros*, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, pela seriedade na condução do curso.

À Profa. Dra. *Sílvia Regina de Almeida Reis*, do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da UFBA, pelo primeiro e constante estímulo na vida acadêmica e científica.

Ao Dr. *Fábio José Barbosa Bezerra*, a quem devo a idealização e o desenvolvimento deste projeto.

À *Paula Cristina Trevilatto*, pela amizade, pela confiança e por me introduzir cientificamente ao mundo da Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. *Moisés Sadigursky*, do Departamento de Anatomia Patológica da UFBA e às amigas, Graça e Jussara, pelo acesso ao Laboratório de Imuno-Patologia da UFBA durante a coleta dos pacientes.

Ao Prof. Dr. *Renato Mazzonetto*, pelo acesso às fichas dos pacientes do Serviço de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP (UNICAMP).

A todos os funcionários da CENIOR (Centro de Implantodontia e Oftalmologia Dr. José Ribeiro), principalmente à *Sandra e Cristiane*, pela paciência e boa-vontade durante a coleta dos pacientes.

Às secretárias do Serviço de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da FOP, *Daiana e Sueli*, pela paciência e ajuda durante a consulta das fichas dos pacientes.

Às secretárias da Pós-Graduação, *Sônia, Érica e Eliane*, pela atenção e auxílio durante todo o curso.

Às bibliotecárias, Marilene e Eloísa, pelo auxílio na formatação das referências bibliográficas.

A todos os professores do Programa de Biologia Buco-Dental, especialmente aos docentes: Profa. Dra. *Darcy de Oliveira Tosello*, Prof. Dr. *Pedro Duarte Novaes*, Prof. Dr. *José Merzel* e Prof. Dr. *Fausto Bérzin*.

A *Cidinha, Eliene, Gustavo, Ivani, Joelma, Suzete e Valquíria*, pelo agradável convívio diário e principalmente pelos divertidos almoços.

A *Jorge*, pelas aulas de inglês e pela disposição em corrigir os *e-mails*, artigos e cartas.

À *Maria Cristina Leme Godoy dos Santos* e aos seus pais, *Edna e Wagner*, pela carinhosa recepção em Piracicaba.

Aos colegas de pós-graduação, que próximos ou já distantes, sempre mantiveram o clima de harmonia e solidariedade durante o curso, em especial aos amigos *Alexandre, Regina e Soninha*.

À amiga *Luciana Valadares*, pelo companheirismo, conselhos e risadas. Você realmente tornou minha estada em Piracicaba muito mais prazerosa.

Aos novos amigos que conquistei ao longo do curso, especialmente a *Dani, Dinda, Marcelo, Márcia, Maurício, Mônica, Poli e Wagner*, pelos momentos felizes que me ajudaram a superar a saudade de casa.

A *Chico*, pelo amor, incentivo e por compreender os momentos em que estive ausente.

Aos amigos de Salvador, pela força e encorajamento apesar da distância.

Ao CNPq pelo patrocínio oferecido através da Bolsa de Mestrado (processo 131363/2002-6).

A todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

O DIA MAIS BELO? HOJE (Madre Teresa de Calcutá)

A coisa mais fácil? Errar.
O maior obstáculo? O medo.
O maior erro? O abandono.
A raiz de todos os males? O egoísmo.
A distração mais bela? O trabalho.
A pior derrota? O desânimo.
Os melhores professores? As crianças.
A primeira necessidade? Comunicar-se.
O que mais traz felicidade? Ser útil aos demais.
O maior mistério? A morte.
O pior defeito? O mau humor.
A pessoa mais perigosa? A mentirosa.
O pior sentimento? O rancor.
O presente mais belo? O perdão.
O mais imprescindível? O lar.
A rota mais rápida? O caminho certo.
A sensação mais agradável? A paz interior.
A proteção mais efetiva? O sorriso.
O melhor remédio? O otimismo.
A maior satisfação? O dever cumprido.
A força mais potente do mundo? A fé.
As pessoas mais necessárias? Os pais.
A mais bela de todas as coisas? O amor.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	69

RESUMO

A falha precoce do implante ocorre antes da instalação da prótese e é caracterizada pela ausência de osseointegração, havendo a formação de uma cápsula fibrosa ao redor do implante. Em alguns pacientes este tipo de falha ocorre sem a detecção de uma causa clínica aparente, sugerindo a incapacidade de regeneração do hospedeiro. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência genética no estabelecimento da osseointegração. Este estudo retrospectivo teve como objetivo investigar a possível correlação entre a perda precoce de implantes e polimorfismos funcionais nos genes da interleucina-1 (IL-1), da interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Para tanto, foram analisados seis polimorfismos genéticos em 25 pacientes que apresentaram perda precoce de um ou mais implantes (grupo teste) e em 32 indivíduos que apresentavam um ou mais implantes saudáveis e em função por no mínimo um ano (grupo controle). Os polimorfismos estudados foram: IL-1A(C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (G-174C) e TNF-A (G-308A). O DNA foi obtido a partir de células epiteliais bucais e os polimorfismos foram analisados pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), seguida de digestão com enzimas de restrição (RFLP-polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição). Os produtos do PCR/RFLP foram analisados em géis de poli-acrilamida a 10%, corados por prata. O programa ARLEQUIM foi utilizado para determinar os possíveis haplótipos e determinar o desequilíbrio de ligação entre os *loci* polimórficos da IL-1. As frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram comparadas entre os grupos teste e controle pela simulação de Monte Carlo (programa CLUMP), ao nível de significância de 5%. Não foram observadas diferenças significantes nas frequências alélicas, genotípicas ou haplotípicas investigadas. Os *loci* polimórficos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) apresentaram-se em forte desequilíbrio de ligação, tanto no grupo controle ($p=0.00014$) como no grupo teste ($p=0.0238$). Com base nos resultados, concluiu-se que os polimorfismos analisados não estão associados com a perda precoce de implantes endósseos na população estudada.

ABSTRACT

Early implant failure occurs before prosthesis placement. There is no establishment of osseointegration, but the formation of a fibrous tissue around implant. In some situations, clinical factors alone do not explain why some patients develop this kind of loss, suggesting an impaired healing ability. The aim of this retrospective study was to investigate the relationship between early implant failure and functional polymorphisms of the IL-1, IL-6 and TNF- α genes. Six genetic polymorphisms were analyzed in 25 patients that suffered one or more early implant failures (test group) and in 32 individuals with one or more healthy implants in function for at least one year (control group). The following polymorphisms were analyzed: IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (G-174C) and TNF-A (G-308A). The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the genomic DNA from oral mucosa cells and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) to identify the polymorphisms. Restriction products were visualized by using electrophoresis on vertical 10 % polyacrylamide gels, followed by silver staining. The Arlequin software was used to determine haplotype frequencies and linkage disequilibrium among the IL-1 polymorphic sites. Monte Carlo simulation ($p < 0.05$) was used to assess differences for allele, genotype and haplotype frequencies between control and test groups. No statistically significant differences were found in allelic frequencies, genotype or haplotype distribution of the polymorphisms. IL-1A (C-889T) and IL-1B (C+3953T) polymorphic sites showed strong linkage disequilibrium ($p = 0.00014$ for control and $p = 0.0238$ for test group). It was concluded that these polymorphisms are not associated with early implant failure in the studied population.

1. INTRODUÇÃO

O advento dos implantes osseointegrados revolucionou os rumos da odontologia a partir dos anos 80. Atualmente, eles são indicados para o tratamento de diferentes situações de edentulismo por apresentarem resultados previsíveis, reproduzíveis e estáveis ao longo do tempo.

Apesar dos altos níveis de sucesso demonstrados por estudos longitudinais (Cox & Zarb, 1987; Albrektsson, 1988; Adell *et al.*, 1990), todo profissional enfrentará algum tipo de fracasso de forma inevitável. A avaliação dos fatores que levam a falhas no tratamento com implantes é de vital importância para que possam ser evitadas.

As falhas biológicas dos implantes estão relacionadas à incapacidade do hospedeiro em estabelecer ou manter a osseointegração, e cronologicamente podem ser subdivididas em: primária ou precoce, quando a osseointegração não ocorre, e secundária ou tardia, quando a osseointegração não é mantida após ter ocorrido (Esposito *et al.*, 1998a).

O trauma cirúrgico e condições anatômicas desfavoráveis são considerados supostas causas da perda precoce (Esposito *et al.*, 1998b). Entretanto, em algumas situações, este tipo de falha ocorre sem a detecção de uma causa clínica aparente (Kronström *et al.*, 2000; Deas *et al.*, 2002), sugerindo a incapacidade de cicatrização do hospedeiro.

A ferida cirúrgica, em decorrência da inserção do implante, desencadeia uma resposta inflamatória aguda, na qual inúmeras citocinas e fatores de crescimento medeiam eventos que podem culminar em um processo de regeneração ou de reparo (Schwartz *et al.*, 1999). Neste momento, níveis excessivos de citocinas pró-inflamatórias, com atividade de reabsorção óssea, como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), poderiam de alguma forma prejudicar o estabelecimento da osseointegração do implante.

Polimorfismos genéticos funcionais foram descritos nos genes da IL-1, da IL-6 e do TNF- α (di Giovine *et al.*, 1992; Pociot *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992; Tarlow *et al.*, 1993; McDowell *et al.*, 1995; Olomolaiye *et al.*, 1998). Alelos específicos desses polimorfismos foram associados não só à maior expressão das respectivas citocinas (Pociot *et al.*, 1992; Kroeger *et al.*, 1997; Fishman *et al.*, 1998; Santilla *et al.*, 1998), como também à severidade e/ou pré-disposição a doenças de natureza inflamatória (Kornman *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2001; Witte *et al.*, 2002; Vozarova *et al.*, 2003), inclusive a doença periodontal na população brasileira (Trevilatto *et al.*, 2003).

Levando-se em consideração que a resposta do hospedeiro desempenha importante papel no estabelecimento da osseointegração, torna-se relevante analisar a influência de polimorfismos genéticos em pacientes que apresentaram perda precoce de implantes dentais. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a possível correlação entre a perda precoce de implantes e seis polimorfismos genéticos previamente descritos: IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (G-174C) e TNF-A (G-308A).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A preocupação em substituir dentes naturais perdidos para o restabelecimento funcional e/ou estético advém de épocas remotas. Implantes confeccionados em diversas ligas metálicas e diferentes formatos foram desenvolvidos na tentativa de tratar o edentulismo (Mangini & Schiochett, 1999). No entanto, a implantodontia tomou um considerável impulso a partir do trabalho de Branemark *et al.* (1969), citado por Carvalho & Ponzoni (2002), que demonstraram a real possibilidade de implantes dentais osseointegrados.

Inicialmente, Branemark *et al.* (1969), citados por Carvalho & Ponzoni (2002), definiram a osseointegração como a conexão direta, estrutural e funcional entre osso vital, organizado e a superfície de um implante de titânio capaz de receber carga funcional. Na realidade, biologicamente, não existe evidência de contato total entre osso e implante, mas sim de maior ou menor quantidade de tecido fibroso (Carvalho & Ponzoni, 2002). Em decorrência dessa observação, surgiram os termos “fibrointegração” ou “fibro-ósseo-integração” que diferem totalmente do quadro histopatológico de encapsulamento fibroso evidenciado na perda do implante (Campos Júnior & Passanezi, 1996).

Atualmente, o sucesso clínico de um implante não é baseado apenas na sua permanência nos arcos. Para ser considerado bem-sucedido, o implante deve atender a certos critérios. Em 1986, Albrektsson *et al.* propuseram critérios de sucesso que posteriormente foram modificados por Smith & Zarb (1989) e incluem: (1) imobilidade do implante quando não-conectado à prótese; (2) ausência de radiolucidez periimplantar; (3) perda óssea vertical menor que 0,2 mm anualmente, após o primeiro ano em função; (4) ausência de sinais e sintomas persistentes e/ou irreversíveis como dor, infecção, neuropatias, parestesia ou violação do canal mandibular; (5) o implante deve estar conectado à prótese e em função. Caso o implante não atenda a algum dos critérios mencionados, pode ser considerado como “sobrevivente”, ou seja, ainda em função, mas com algum tipo de problema (Campos Júnior & Passanezi, 1996).

O insucesso do implante ocorre quando este não alcança seus objetivos (funcional, estético ou fonético) e pode ter diversas razões (El Askary *et al.*, 1999a). Segundo Esposito *et al.* (1998a), as falhas podem ser divididas em 4 tipos: biológicas, mecânicas (fratura dos implantes ou prótese), iatrogênicas (mau posicionamento do implante) e associadas à adaptação inadequada do paciente por problemas psicológicos, estéticos ou fonéticos.

As falhas biológicas estão relacionadas com problemas no processo de osseointegração e cronologicamente podem ser classificadas em precoce ou tardia. No primeiro grupo estão incluídos implantes que fracassaram antes da instalação da prótese, nos quais a osseointegração não foi estabelecida. A falha tardia ocorre após a instalação da prótese e é caracterizada pela perda de uma osseointegração inicial quando o implante entra em função (Esposito *et al.*, 1998a). Essa classificação se torna importante porque a etiologia dos dois tipos de falhas normalmente é diferente (van Steenberghe *et al.*, 2002). Independente da classificação, a falha biológica está intimamente relacionada à presença de uma cápsula fibrosa ao redor do implante, que promove sua mobilidade, levando à necessidade de remoção do mesmo (Campos Júnior & Passanezi, 1996; Piattelli *et al.*, 1998a).

2.1 O MECANISMO DE OSSEOINTEGRAÇÃO

A perda precoce resulta da incapacidade em estabelecer um contato íntimo entre osso e implante. Isso significa que a regeneração óssea após a inserção do implante foi deficiente ou prejudicada. Os mecanismos que normalmente permitem a regeneração da ferida por meio da aposição óssea falham e se forma um tecido fibroso cicatricial ao redor do implante (Esposito *et al.*, 1999a).

Campos Júnior & Passanezi (1996) resumiram em três estágios os eventos que se seguem após o trauma cirúrgico originado pela instalação do implante: 1) formação de um coágulo e mudanças circulatórias devido à liberação de uma cascata de mediadores

químicos que atuam sobre vasos e células sobreviventes e atraem células a partir do sangue e tecido circunjacente; 2) o segundo estágio evolui para a regeneração, com a substituição da região da ferida por osso, ou para a reparação, na qual haverá substituição por um tecido não mineralizado, como algum tipo de colágeno cicatricial; 3) o terceiro estágio é caracterizado pela maturação da ferida por meio do mecanismo de remodelação do tecido ósseo.

Os fenômenos bioadesivos entre osso e implante não se dão exatamente entre o metal do corpo do implante e o tecido ósseo, mas entre uma camada de óxido na superfície do metal e a superfície em neoformação do osso que foi perfurado no processo cirúrgico (Campos Júnior & Passanezi, 1996). O titânio é considerado biocompatível, pois ao menor contato com o ar atmosférico forma-se espontaneamente uma camada de óxido que é bastante resistente aos líquidos corporais e é inerte aos tecidos por ser praticamente insolúvel (Carvalho & Ponzoni, 2002).

Os eventos coordenados que ocorrem durante a regeneração do tecido periimplantar foram resumidos por Schwartz *et al.* (1999) em: adsorção de proteínas, aderência celular, produção de fatores locais, proliferação, diferenciação, produção de matriz osteóide e calcificação. Imediatamente após sua inserção, a superfície do implante é revestida por uma camada de componentes orgânicos e inorgânicos do plasma. Esse fenômeno ocorre de segundos a minutos e é consequência da adsorção de proteínas, lipídios, açúcares e íons na superfície de óxido do implante. Em seguida, células irão aderir-se à superfície adsorvida por meio de seus receptores de integrina. Como em qualquer resposta inflamatória aguda, há a liberação de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento sintetizados por plaquetas, células polimorfonucleares e macrófagos. Como resultado da produção de fatores locais, células mesenquimais migram sobre o coágulo e sintetizam uma rede de colágeno que será o suporte para o reparo de ferida. Essas células mesenquimais logo passam também a produzir fatores locais que podem agir de uma forma autócrina ou parácrina em outras células. A produção de fatores locais determina a qualidade do osso formado ou o desenvolvimento de cápsula fibrosa. Os eventos seguintes

são caracterizados pela proliferação e diferenciação celular em osteoblastos que iniciam a produção de matriz osteóide com posterior calcificação (Schwartz *et al.*, 1999).

As propriedades do implante devem promover a produção e liberação de fatores locais que estimulem a osteogênese e retardem a reabsorção óssea (Schwartz *et al.*, 1999).

Perala *et al.* (1992) avaliaram a produção *in vitro* de IL-1 β e TNF- α por células mononucleares sanguíneas humanas expostas a cinco tipos diferentes de implantes disponíveis no mercado. Foram observados níveis significativamente elevados destas citocinas, sugerindo-se que o material dos implantes não é fisiologicamente inerte. No entanto, os autores ressaltaram que estas citocinas participam da homeostasia óssea e ainda não se tem conhecimento em que níveis elas passam a ter um papel patológico, prejudicando a osseointegração. Em um estudo anterior realizado pelos mesmos autores (Perala *et al.*, 1991), todos os implantes dentais testados demonstraram ser capazes de ativar o sistema complemento. O sistema complemento ativado pode estimular monócitos e macrófagos a secretarem IL-1. No entanto, a ativação do complemento apresentada nesse estudo não foi suficiente para estimular a produção desta citocina.

Spyrou *et al.* (2002) avaliaram níveis de citocinas estimuladoras (IL-1 e IL-6) e inibidoras (IL-18 e osteoprotegerina) de reabsorção óssea produzidas por osteoblastos que foram cultivadas sobre discos de titânio de diferentes composições (titânio comercialmente puro, liga vanádio-alumínio-titânio, titânio jateado com óxido e titânio com tratamento especial Astra-Tech). Todos os materiais analisados estimularam a produção de IL-1, IL-6 e IL-18 em níveis superiores aos produzidos por células cultivadas em meio controle de poliestireno. Um estudo anterior (Shida *et al.*, 2000) também demonstrou que osteoblastos expostos a partículas de titânio demonstraram expressão aumentada de IL-6, por meio de um processo que envolveu fagocitose e sinalização intracelular.

Schwartz *et al.* (1997) observaram que osteoblastos cultivados sobre a superfície de titânio produziram TGF- β (fator transformador do crescimento-beta) e PGE₂

(prostaglandina E₂) e que a produção foi diretamente proporcional à rugosidade da superfície do implante.

Macrófagos expostos a partículas de titânio produziram altas concentrações de TNF- α , enquanto que, as concentrações de IL-1 α , IL-6 e prostaglandina E₂ permaneceram baixas. Os sobrenadantes da cultura destas células demonstraram atividade significativa de inibição da formação óssea e essa atividade era anulada pela adição de anticorpo anti-TNF- α (Tsutsui *et al.*, 1999).

Schierano *et al.* (2000) investigaram a expressão de citocinas e TGF- β na mucosa gengival de pacientes tratados com *overdentures* sobre implantes em diferentes períodos do tratamento: antes da instalação dos implantes, durante a conexão dos *abutments* e 4, 8 e 12 meses após a instalação da prótese. Uma elevada expressão de TGF- β foi observada a partir da instalação do *abutment* e persistiu durante todo o período do estudo. Considerando as citocinas pró-inflamatórias, a expressão de IL-6 e de IL-8, que estavam aumentadas antes da cirurgia, decresceram nos demais períodos, enquanto que, a expressão de IL-1 β se manteve aumentada até o final do estudo. Os autores sugeriram que a expressão aumentada de IL-1 β funcionou como mecanismo para controlar a produção excessiva de TGF- β , pois sua produção em excesso poderia induzir hiperplasia ou formação de tecido fibroso.

Pietruski *et al.* (2001) mensuraram os níveis sanguíneos de IL-1, IL-6 e IL-8 em pacientes tratados com implantes dentais em três momentos: antes da cirurgia de instalação do implante, um dia e quatro meses após a cirurgia. Em todos os dez pacientes analisados, os níveis de IL-1 foram similares nas três análises, enquanto que os níveis de IL-6 e IL-8 aumentaram de forma significativa no primeiro dia pós-cirúrgico e voltaram aos valores iniciais quatro meses após a cirurgia. Esses resultados refletem a presença do processo inflamatório local resultante da cicatrização periimplantar.

2.2 FATORES ASSOCIADOS À PERDA PRECOCE DE IMPLANTES

Os fatores associados à perda dos implantes podem ser subdivididos em: fatores exógenos, que estão relacionados ao operador ou ao biomaterial, e fatores endógenos que estão associados ao hospedeiro e podem ser de caráter local ou sistêmico. Essa subdivisão tem apenas propósito didático, pois fatores exógenos e endógenos estão intimamente relacionados e sofrem influência recíproca (Esposito *et al.*, 1998b).

A investigação dos fatores relacionados à manutenção da osseointegração em longo prazo tem demonstrado que o desenvolvimento de periimplantite (infecção bacteriana) ou a presença de sobrecarga oclusal estão principalmente associados às perdas tardias de implantes (van Steenberghe *et al.*, 1990; De Lorenzo *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 1998b). Entretanto, poucas informações em relação à perda precoce de implantes estão disponíveis (Kronström *et al.*, 2000).

2.2.1 Fatores exógenos

Os principais fatores exógenos relacionados ao operador são a experiência clínica e o trauma cirúrgico (Esposito *et al.*, 1998b). Apesar de alguns estudos relatarem maior incidência de perda precoce em implantes instalados por cirurgiões com menor experiência (Morris *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1997), a influência do operador sobre o insucesso do implante é uma questão que deve ser analisada com cuidado. Um cirurgião experiente realiza uma seleção mais apurada do paciente e do sítio de instalação do implante, entretanto, a autoconfiança excessiva desse profissional pode levá-lo a subestimar casos complexos, aumentando o risco de perda do implante (Esposito *et al.*, 1998b).

O trauma cirúrgico relacionado à perda precoce é principalmente ocasionado pelo superaquecimento durante a osteotomia (Esposito *et al.*, 1998b). Durante a fresagem óssea para a colocação de implantes, é gerada uma quantidade de energia que produz calor. Este é transmitido ao tecido e absorvido de acordo com a condutividade do mesmo

(Tehemar, 1999, citado por Carvalho & Pisoni, 2002). Carvalho & Ponzoni (2002) afirmam que caso o dano térmico seja muito severo, a capacidade reparadora do osso será prejudicada, pois o organismo levará muito tempo para reabsorver o osso inviável e a proliferação fibroblástica, que é mais rápida, produzirá uma interface fibrosa entre osso e implante. Entretanto, se o dano for pequeno, permitindo uma rápida eliminação do tecido inviável, os osteoblastos conseguirão povoar a região e produzir uma interface osseointegrada.

Salonen *et al.* (1993) avaliaram as possíveis causas do insucesso de implantes em pacientes tratados no Instituto de Odontologia da Universidade de Oulu (Finlândia), entre 1985 e 1990. As perdas precoces foram atribuídas ao trauma cirúrgico relacionado ao superaquecimento do osso cortical da mandíbula durante a instalação de implantes de maior comprimento.

A análise histológica de 8 implantes instalados na mandíbula e que apresentaram perda precoce revelou ausência de organização de coágulo sanguíneo, ausência de neoformação óssea periimplantar e a presença de seqüestro ósseo, de bactérias e de infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos e plasmócitos. Os autores sugeriram que o superaquecimento ósseo provavelmente ocasionou a perda dos implantes, apesar de que em algumas situações parece não ter sido a única causa (Piattelli *et al.*, 1998b).

Esposito *et al.* (1999a) analisaram histomorfologicamente os tecidos ao redor de 20 implantes que apresentaram perda precoce antes, durante e após a instalação do *abutment*. Apenas três implantes foram perdidos antes da instalação do *abutment*, sendo que todos apresentaram complicações cirúrgicas, sinais de infecção e demonstraram histologicamente presença de tecido conjuntivo bastante vascularizado com poucas células inflamatórias. O trauma cirúrgico, micromovimentos e cicatrização deficiente do hospedeiro foram sugeridos como responsáveis pela perda de implantes assintomáticos com mobilidade detectada durante a instalação do *abutment* e que estavam circundados por tecido conjuntivo denso, rico em fibroblastos, mas com poucas células inflamatórias. Em

alguns implantes, a presença de proliferação epitelial com tecido ricamente infiltrado por plasmócitos e polimorfonucleares foi interpretada como desenvolvimento de infecção assintomática, apesar de não ser constatada presença de bactérias. Os implantes perdidos após a instalação do *abutment* demonstraram uma interface heterogênea com porções de tecido conjuntivo altamente vascularizado e porções de osso, indicando o rompimento de uma interface pobremente mineralizada.

As propriedades da superfície do implante como composição, topografia, rugosidade e energia de superfície desempenham importante papel em todas as etapas do processo de osseointegração, principalmente na etapa de adesão celular (Scharwitz *et al.*, 1999). O efeito da microestrutura superficial na adesão celular depende do tipo de célula. Células gengivais do tipo fibroblastos de humanos aderem melhor às superfícies eletropolidas que às superfícies tratadas com ácido ou jateadas. Em contrapartida, macrófagos, células epiteliais e osteoblastos são mais atraídos por superfícies rugosas (Lima *et al.*, 2003). Parece óbvio que superfícies rugosas (tratadas com jateamento e/ou ataque ácido) apresentam vantagens na adesão, expansão e proliferação de osteoblastos, entretanto, poucos estudos foram realizados *in vivo* e não se sabe até que ponto as características da superfície do implante influenciam a adesão de tecidos moles e duro (Meyle, 1999).

O papel dos contaminantes de superfície no insucesso dos implantes ainda não está completamente esclarecido (Esposito *et al.*, 1998b). Foi sugerido que contaminantes de superfície podem ser liberados exacerbando e perpetuando a resposta inflamatória, como consequência, o processo de cicatrização poderia ser alterado (Baier & Meyer, 1988). Esposito *et al.*, (1999b) não observaram diferenças na espessura ou composição da camada de óxido ao avaliarem a superfície de 10 implantes que sofreram perda precoce, 12 implantes que sofreram perda tardia e 2 implantes que não foram utilizados (controles). Os autores não acreditam que contaminantes de superfície desempenharam algum papel nesses insucessos e sugerem como possíveis razões para a perda precoce: cicatrização deficiente, presença de infecção assintomática ou rompimento de frágil interface osso-implante após a conexão do *abutment*.

2.2.2 Fatores endógenos

A quantidade e qualidade óssea são fatores endógenos locais com grande influência sobre a perda de implantes (Esposito *et al.*, 1998b). Os ossos tipos I, II e III oferecem uma grande força interna e bastante cortical para estabilizar o implante durante sua instalação, enquanto que o osso tipo IV apresenta pouca cortical e mínima força interna. A avaliação de 1.054 implantes instalados em diferentes qualidades ósseas demonstrou que dos implantes instalados em osso tipo I, II ou III, apenas 3% (29/952) apresentaram falhas, enquanto que, 36 implantes (35%) dos 102 instalados em osso tipo IV não osseointegraram (Jaffin & Berman, 1991).

A análise retrospectiva de 4.641 implantes instalados na Clínica Branemark (Gothenburg, Suécia) revelou que apenas 69 implantes (1,5%) sofreram falha precoce. Os autores sugeriram que o volume e a qualidade óssea são os principais fatores associados a esse tipo de fracasso, pois a maioria dos insucessos ocorreu em maxilas completamente edêntulas com reabsorção severa e osso tipo IV. Os implantes perdidos na mandíbula haviam sido instalados em regiões de osso tipo I (Friberg *et al.*, 1991).

A avaliação de 144 implantes instalados em 120 pacientes revelou a ocorrência de 16 perdas precoce. Os autores sugerem que pacientes que possuem qualidade óssea tipo IV em combinação com pouco volume ósseo constituem o grupo de maior risco para a perda de implantes (Hutton *et al.*, 1995).

O osso tipo IV está associado à falta de estabilidade primária do implante, que por sua vez, promove micromovimentos, levando à cicatrização com tecido fibroso no lugar da regeneração óssea (Campos Júnior & Passanezi, 1996).

Truhlar *et al.* (1994) avaliaram a ocorrência de perdas precoces em relação à qualidade óssea e observaram que os implantes instalados em osso tipo I demonstraram maior índice de perda do que os instalados em osso tipo IV. Lindberg *et al.* (1988), citados por Piattelli *et al.* (1998b), afirmam que na mandíbula, a presença de osso tipo I está

principalmente associado à falhas durante o período de osseointegração, devido ao superaquecimento do sítio cirúrgico.

A ocorrência de fracasso dos implantes não parece estar distribuída de forma aleatória na população, ou seja, há um pequeno grupo de indivíduos no qual ocorrem inúmeras perdas (Tonetti, 1998). Esse fato foi observado a partir de estudos, como o realizado por Weyant & Burn (1993), no qual a análise de 598 pacientes (totalizando 2098 implantes) revelou que 81 implantes foram removidos de apenas 45 pacientes ao longo de aproximadamente 5 anos. Uma situação similar foi verificada por Hutton *et al.* (1995), pois ao acompanharem 120 pacientes portadores de *overdenture* implanto suportada, observaram que 40 implantes fracassaram e foram removidos de 21 pacientes. Os mesmos autores concluíram que indivíduos com um implante falho são mais propensos a sofrerem outras perdas. Essas observações parecem indicar a existência de grupos de alto risco para a perda de implantes (Tonetti, 1998) e sugerem que fatores sistêmicos ou genéticos podem desempenhar um importante papel nestes insucessos (Esposito *et al.*, 1998a).

Um estudo retrospectivo (Ekfeldt *et al.*, 2001) avaliou as possíveis causas de múltiplas falhas de implantes instalados na maxila de 27 pacientes. Do total de 201 implantes perdidos, 55 (43%) foram classificados como perda precoce. A ocorrência de complicações cirúrgicas, como o superaquecimento ósseo e a infecção, foi a principal causa atribuída a esses insucessos. Ainda nesse estudo, alguns fatores relacionados ao hospedeiro como diabetes, osteoporose e uso crônico de medicamentos pareceram desempenhar importante papel na perda precoce dos implantes.

Em uma análise retrospectiva, van Steenberghe *et al.* (2002) observaram que fumo severo (mais de 10 cigarros ao dia), exposição prévia à quimioterapia ou radioterapia, qualidade e quantidade óssea deficientes e claustrofobia (associada à quebra das normas operatórias de assepsia) foram os fatores de maior incidência em pacientes que sofreram perdas precoces, sendo que a maioria dos pacientes apresentou mais de um desses fatores.

A comparação entre 40 indivíduos com sucesso na osseointegração de implantes e 40 pacientes que sofreram perda precoce sem nenhuma causa evidente não

demonstrou diferenças em relação ao tipo de edentulismo (total ou parcial) ou à razão da perda dentária (periodontite ou cárie). Entretanto, indivíduos com implantes osseointegrados apresentaram elevados níveis séricos de IgG contra *B forsythus* e *S aureus*. Em indivíduos com níveis séricos mais baixos, a presença dessas bactérias pode estimular a liberação de citocinas que exacerbam a resposta inflamatória, resultando no insucesso da osseointegração. No entanto, o mecanismo pelo qual esses patógenos poderiam causar infecção em implantes submersos ainda não está esclarecido (Kronström *et al.*, 2000).

Wilson & Nunn (1999) constataram que o fumo pode aumentar 2.5 vezes o risco à perda de implantes. Um protocolo envolvendo a abstinência do fumo 1 semana antes e 8 semanas após a cirurgia de instalação do implante parece contribuir para o índice de sucesso da osseointegração. Analisando a ocorrência de falhas precoces em 78 pacientes (223 implantes), observou-se que pacientes não-fumantes ou fumantes que seguiram o protocolo de abstinência demonstraram índice de falha significativamente menor do que os pacientes fumantes que não seguiram o protocolo (Bain, 1996). Em outro estudo, demonstrou-se que pacientes fumantes apresentaram maior índice de complicações durante a regeneração periimplantar (46%), bem como de falhas precoces (4%), quando comparados a pacientes não-fumantes (31% e 2%, respectivamente). Entretanto, não se pode afirmar que o fumo é o principal ou único fator associado à falha precoce de implantes (Schwartz-Arad *et al.*, 2002).

2.3 PAPEL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E DE SEU CONTROLE GENÉTICO NO METABOLISMO ÓSSEO

2.3.1 Interleucina-1 (IL-1)

A interleucina-1 (IL-1) é geralmente considerada a citocina pró-inflamatória com importância central na iniciação e manutenção das respostas inflamatórias agudas (Sim, 1993). Sua produção é estimulada por produtos bacterianos, injúrias traumáticas ou diferentes antígenos. Apesar do macrófago ativado ser a principal fonte celular, esta

citocina também é sintetizada, dentre outros tipos celulares, por células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e condrócitos (Dinarello, 1988). Dessa forma, a IL-1 possui fontes de produção local em potencial na ausência de infiltrados ricos em macrófagos (Abbas *et al.* 1998).

As atividades pró-inflamatórias da IL-1 são exercidas por duas espécies de polipeptídeos: IL-1 α e IL-1 β . As duas formas de IL-1 mostram menos que 30% de homologia estrutural entre si, mas ambas ligam-se aos mesmos receptores de superfície e suas atividades biológicas são essencialmente idênticas (Abbas *et al.*, 1998). A IL-1 α parece se concentrar na membrana celular, enquanto que a IL-1 β é secretada para o meio extracelular e parece ser a principal responsável pelas atividades da IL-1 (Dinarello, 1988). A família da IL-1 ainda é constituída por um terceiro polipeptídeo, denominado antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra). Esta molécula funciona como um inibidor competitivo, pois se liga aos receptores da IL-1 sem exercer atividade biológica (Abbas *et al.*, 1998).

A principal função da IL-1, juntamente com a IL-6 e o TNF- α , é mediar a resposta inflamatória do hospedeiro na imunidade inata, desempenhando atividades pró-inflamatórias. A IL-1 e o TNF- α possuem propriedades biológicas muito similares e atuam sinergisticamente (Sim, 1993). Além de atuar como mediadora da inflamação local, a IL-1 pode ter efeitos sistêmicos, produzindo alterações neurológicas, metabólicas, hematológicas e endócrinas (Dinarello, 1988). No sítio da inflamação, a IL-1 atua sobre fagócitos mononucleares e endotélio vascular, aumentando ainda mais a síntese de IL-1 e induzindo a síntese de IL-6. Nas células endoteliais, promove a coagulação e aumenta a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão leucocitária (Abbas *et al.* 1998). Esta citocina atua sobre fibroblastos estimulando sua proliferação e a transcrição de colágeno tipo I, III e IV. Dessa forma, o desenvolvimento de fibrose parece ser em parte mediado pela IL-1 (Dinarello, 1988). A IL-1 também possui efeitos significativos no tecido ósseo. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que esta citocina desempenha potente atividade na reabsorção óssea, podendo em certas condições estimular a formação de osso. Osteoclastos possuem receptores de superfície para a IL-1, que quando ativados estimulam a produção

de prostaglandina e da própria IL-1, além de modular a expressão gênica de diversas outras citocinas e enzimas. Dessa forma, sugere-se que a IL-1 participa da patogênese de doenças que envolvem o tecido ósseo (Tatakis, 1993).

A IL-1 pode desempenhar atividades benéficas ou destrutivas ao hospedeiro. Ela é responsável por sinalizar a invasão do agressor e estimular respostas que contribuem para a eliminação do mesmo. Entretanto, quando sua produção e atividade persistem sem uma regulação adequada, a IL-1 também pode contribuir para o desenvolvimento de processos patológicos (Dinarello, 1988). Nesse contexto, níveis e expressão elevada de IL-1 foram observados no fluido crevicular (Masada *et al.*, 1990; Preiss & Meyle, 1994; Tsai *et al.*, 1995) e nos tecidos gengivais (Stashenko *et al.*, 1991; Jandinski *et al.*, 1991; McGee *et al.*, 1998) de pacientes com periodontite, sugerindo que a produção local desta interleucina contribui para a destruição dos tecidos periodontais.

A IL-1 β também parece participar da destruição tecidual durante o processo de periimplantite. Implantes com sinais de inflamação tecidual apresentaram níveis elevados de IL-1 β no fluido crevicular quando comparados a sítios com implantes saudáveis (Kao *et al.*, 1995; Panagakos *et al.*, 1996; Curtis *et al.*, 1997; Aboyoussef *et al.*, 1998). Salcetti *et al.* (1997) avaliaram os níveis de moléculas estimuladoras de reabsorção óssea (PGE₂, IL-1 β e IL-6) e de formação óssea (TGF β e PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas) no fluido crevicular periimplantar em 2 grupos de pacientes: (1) pacientes que apresentavam periimplantite, sendo que alguns apresentavam também implantes saudáveis e (2) pacientes que só apresentavam implantes saudáveis, constituindo o grupo controle. Os resultados revelaram níveis significativamente elevados de PGE₂, IL-1 β e PDGF no fluido crevicular dos pacientes do grupo 1 em relação aos pacientes do grupo controle. Entretanto, diferença significativa não foi observada quando o fluido de implantes saudáveis foi comparado ao fluido de implantes com periimplantite no mesmo paciente. Os autores concluíram que níveis de IL-1 β parecem ser mais relevantes no indivíduo do que no sítio do implante e sugerem que em indivíduos com periimplantite, os implantes saudáveis correm risco de futuras falhas.

Os três polipeptídeos que constituem a família da interleucina-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) são codificados pelos genes IL-1A, IL-1B e IL-1RN, respectivamente. Esses genes estão próximos e localizados no braço longo do cromossomo 2 (Nicklin *et al.*, 1994).

Na posição -889 do promotor do gene IL-1A, foi descrito um polimorfismo caracterizado pela substituição de uma base citosina (C) por uma base timina (T), originando dois possíveis alelos: alelo C e alelo T (McDowell *et al.*, 1995). Foi demonstrado que pacientes que carregam o alelo T podem produzir elevados níveis da proteína IL-1 α (Shirodaria *et al.*, 2000). Além disso, a frequência deste alelo foi relacionada à severidade e/ou ao desenvolvimento de algumas doenças, como artrite reumatóide juvenil (McDowell *et al.*, 1995) e doença de Alzheimer (Combarros *et al.*, 2002).

Na posição -511 do promotor e na posição +3953 do exon 5 do gene IL-1B, foram descritos polimorfismos também bi-alélicos e caracterizados pela substituição de uma base C por uma T (di Giovine *et al.*, 1992; Pociot *et al.*, 1992). Os alelos T de ambos os polimorfismos foram relacionados à produção de elevados níveis da proteína IL-1 β (Pociot *et al.*, 1992; Hwang *et al.*, 2002), bem como à severidade e/ou desenvolvimento de diversas doenças como a asma (Karjalainen *et al.*, 2002) e complicações hepáticas (Takamatsu *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que o alelo T do polimorfismo IL-1B (C+3953T) parece estar implicado no risco e severidade da periodontite (Gore *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2002).

No intron 2 do gene IL-1RN, foi identificado um polimorfismo denominado VNTR (número variável de repetições em tandem), caracterizado por uma seqüência de 86 pares de base (86 pb) que se repete em número variável. Este polimorfismo fornece cinco possíveis alelos, que correspondem à presença de 2, 3, 4, 5 ou 6 repetições dessa seqüência (Tarlow *et al.*, 1993). Foi demonstrado que o alelo 2 deste polimorfismo tem efeito no aumento dos níveis de IL-1ra (Danis *et al.*, 1995; Hurme & Santtila, 1998) e está relacionado à severidade e/ou pré-disposição a algumas doenças, como a diabetes (Blakemore *et al.*, 1996) e a alopecia areata (Cork *et al.*, 1996).

Em 1997, Kornman *et al.* observaram que na população europeia, indivíduos caucasianos que apresentavam um genótipo composto, constituído simultaneamente pelo alelo T dos polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T), estavam mais propensos a desenvolver periodontite em grau severo. Posteriormente, foi demonstrado desequilíbrio de ligação entre esses dois *loci* polimórficos (Gore *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 1999). A investigação deste genótipo composto em pacientes que apresentaram perda de implantes não demonstrou correlação significativa (Wilson & Nunn, 1999; Rogers *et al.*, 2002). Recentemente, observou-se que em indivíduos fumantes e portadores do genótipo composto, implantes em função por pelo menos um ano apresentaram maior perda óssea marginal (Feloutzis *et al.*, 2003). Shimpuku *et al.* (2003) encontraram correlação significativa entre o genótipo T/T do polimorfismo IL-1B (C-511T) e a incidência de perda óssea periimplantar precoce (antes da instalação da prótese). Entretanto, a análise do genótipo composto não revelou correlação significativa.

2.3.2 Interleucina-6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6), assim como a IL-1, é uma citocina pró-inflamatória multifuncional. Nos mamíferos, esta molécula pode ser sintetizada por quase todas as células, dentre elas monócitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e osteoblastos. Normalmente, a síntese de IL-6 por monócitos/macrófagos é estimulada por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), enquanto que nas demais células a produção ocorre principalmente em resposta a outras citocinas, como a IL-1 e o TNF- α (Sim, 1993).

Esta interleucina desempenha importante papel nas respostas imunes, inflamatórias e de fase aguda, atuando principalmente na proliferação e diferenciação celular. Estimula a diferenciação de linfócitos B, proliferação de linfócitos T, regula a hemocitopoese na medula óssea e, assim como a IL-1, induz a secreção celular de outras citocinas (Sim, 1993). No metabolismo ósseo, age sozinha ou sinergisticamente com outras citocinas, estimulando diferenciação e ativação osteoclástica (Manolagas, 2000). Níveis

aumentados de IL-6 foram relacionados a diversas doenças, como artrite reumatóide, artrite juvenil sistêmica, osteoporose e psoríase (Ishihara & Hirano, 2002).

O gene humano que codifica a IL-6 está localizado no braço curto do cromossomo 7 e consiste de 5 exons e 4 introns. Na posição -174 do seu promotor foi descrito um polimorfismo bi-alélico, caracterizado pela substituição de uma guanina (G) por uma C (Olomolaiye *et al.*, 1998). Inicialmente o alelo C foi relacionado à menor transcrição gênica e a níveis plasmáticos diminuídos de IL-6. Além disso, o genótipo C/C demonstrou menor frequência em pacientes com artrite crônica juvenil de início sistêmico (Fishman *et al.*, 1998). Estudos acerca da influência deste polimorfismo sobre o risco de doenças têm apresentado resultados controversos. Em algumas investigações, o alelo C se mostrou associado ao maior risco de infarto miocárdico na população espanhola (Revilla *et al.*, 2002) e de perda de enxertos aloplásticos de rim na população alemã (Muller-Steinhardt *et al.*, 2002). Outros estudos demonstraram que o genótipo G/G estava significativamente associado à doença de Alzheimer na população italiana (Pola *et al.*, 2002) e à diabetes mellitus tipo 2 na população espanhola e em americanos nativos (Vozarova *et al.*, 2003). Na população brasileira, o alelo G foi associado ao desenvolvimento da doença periodontal crônica (Trevilatto *et al.*, 2003). Terry *et al.* (2000) demonstraram que a regulação da transcrição gênica da IL-6 é resultado do efeito de vários polimorfismos combinados em haplótipos. Este fato deve ser levado em consideração em estudos populacionais com de associação com doenças.

Até o presente momento não existe relato na literatura sobre a influência de polimorfismos no gene IL-6 sobre a perda de implantes dentais.

2.3.3 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

A principal fonte celular de TNF é o macrófago ativado pelo LPS, embora linfócitos T, células matadoras naturais (NK) e mastócitos ativados também possam secretar esta proteína (Abbas *et al.*, 1998).

Em baixas concentrações, o TNF- α atua sobre células endoteliais vasculares, aumentando a expressão de moléculas de adesão para leucócitos, inicialmente para os neutrófilos e subseqüentemente para monócitos e linfócitos. Dessa forma, há acúmulo fisiológico de leucócitos no local da inflamação. Em macrófagos e em outros tipos celulares, como fibroblastos, esta citocina estimula a produção de IL-1, IL-6, do próprio TNF- α e de quimiocinas (Sim, 1993; Abbas *et al.*, 1998). Em níveis elevados, o TNF- α pode causar dano tecidual e está relacionado a diversas doenças de caráter inflamatório e auto-imune, como artrite reumatóide, lupus eritematoso e diabetes mellitus (Aguillon *et al.*, 2002). Em resposta à infecção, o TNF- α parece desempenhar ação pró-inflamatória na fase inicial, entretanto nas fases mais tardias têm atividade antiinflamatória com o objetivo de limitar a extensão ou duração da inflamação e promover o reparo (Makhatadze, 1998). Em algumas patologias, esta citocina pode agir sobre fibroblastos, contribuindo para a formação de tecido fibroso (Sim, 1993).

O gene TNF-A é responsável pela codificação do TNF- α . Ele está localizado no braço curto do cromossomo 6, na região de classe III do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e contém 4 exons e 3 introns (Makhatadze, 1998). Na posição -308 de sua região promotora foi descrito um polimorfismo bi-alélico, no qual há substituição de uma base G por uma adenina (A) (Wilson *et al.*, 1992). O alelo A foi relacionado à maior transcrição gênica (Kroeger *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 1997) e produção elevada de TNF- α *in vitro* (Louis *et al.*, 1998). Este alelo parece também estar associado ao desenvolvimento de diversas doenças como a doença de Alzheimer (Perry *et al.*, 2001), dermatite de contato (Westphal *et al.*, 2003) e asma (Witte *et al.*, 2002).

Até o presente momento ainda não tinha sido investigada a relação entre polimorfismos no gene TNF-A e a perda de implantes dentais.

3.PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo retrospectivo foi investigar a possível correlação entre a perda precoce de implantes e polimorfismos nos genes da IL-1, da IL-6 e do TNF- α . Para tanto, em pacientes que apresentaram perda precoce de implantes dentais analisou-se a ocorrência de seis polimorfismos genéticos previamente descritos: IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T), IL-1RN VNTR (intron 2), IL-6 (G-174C) e TNF-A (G-308A).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

A amostra do presente estudo foi composta por dois grupos: (1) grupo teste, constituído por 25 pacientes que apresentaram perda precoce de um ou mais implantes e (2) grupo controle que incluiu 32 indivíduos que apresentavam um ou mais implantes saudáveis e em função por no mínimo um ano. As características clínicas da população estudada estão apresentadas na tabela 1 (indivíduos do grupo teste) e tabela 2 (indivíduos do grupo controle). Os indivíduos de ambos os grupos foram selecionados do universo de pacientes tratados no Centro de Implantodontia e Oftalmologia Dr. José Ribeiro (Salvador-BA) entre janeiro de 1993 e dezembro de 2002 e tratados na Clínica dos cursos de Especialização, Mestrado e Doutorado da Área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP (Piracicaba-SP) entre janeiro de 1997 e julho de 2002. Durante o referido período, no Centro Dr. José Ribeiro foram instalados 2270 implantes, ocorrendo 83 perdas (índice de falha de 3,65%). Na Clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba foram instalados 723 implantes, sendo 38 perdidos (índice de falha de 5%). As duas clínicas utilizaram implantes com protocolo de dois estágios cirúrgicos: 3i Implant Innovations, Inc (West Palm Beach, Fl, USA) e Conexão Sistemas de Prótese (São Paulo, SP, Brazil). Os índices de falha estão de acordo com a literatura internacional (Salonen *et al.*, 1993; Hutton *et al.*, 1995; Lekholm *et al.*, 1999).

TABELA 01

Características clínicas dos pacientes incluídos no grupo teste

Paciente	Sexo	Idade	Implantes colocados	Implantes perdidos	Região*	Tipo de osso [#]	Abutment ^{##}	Característica clínica	Permanência do implante
T1	F	47	02	01	Mand ant	II	Antes	Mobilidade	4 meses
T2	F	48	08	01	Max ant	II	Antes	Mobilidade	6 meses
T3	F	53	02	01	Max post	III	Após	Mobilidade	8 meses
T4	F	62	07	03	Mand post	II	Antes	Mobilidade/dor	6 meses
T5	F	50	01	01	Mand post	II	Após	Mobilidade	12 meses
T6	F	51	01	01	Max ant	III	Durante	Mobilidade	7 meses
T7	M	63	02	01	Mand post	II	Após	Dor	11 meses
T8	F	39	08	02	Max post	IV	Antes	Mobilidade	6 meses
T9	M	39	01	01	Mand post	II	Após	Mobilidade/dor	8 meses
T10	M	62	01	01	Max ant	II	Após	Mobilidade	12 meses
T11	M	57	06	03	Mand post	II	Antes	Mobilidade	2 meses
T12	M	18	01	01	Mand post	III	Antes	Mobilidade/dor	3 meses
T13	M	37	04	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	3 meses
T14	M	40	01	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	4 meses
T15	M	37	01	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	3 meses
T16	M	52	06	01	Max ant	----	Antes	Mobilidade	4 meses
T17	M	49	09	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	3 meses
T18	F	59	07	05	Mand ant/post	I	Durante	Mobilidade/dor	5 meses
T19	F	73	01	01	Max post	III	Antes	Mobilidade	6 meses
T20	F	69	03	02	Max post	IV	Durante	Mobilidade	6 meses
T21	M	26	01	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	2 meses
T22	F	54	08	03	Mand post	----	Antes	Mobilidade	3 meses
T23	F	50	02	01	Max post	----	Antes	Mobilidade	4 meses
T24	F	49	02	01	Mand ant	----	Antes	Mobilidade	3 meses
T25	F	57	02	01	Mand post	----	Antes	Mobilidade	4 meses

* Mand ant, mandíbula anterior; Mand post, mandíbula posterior; Max ant, maxila anterior; Max post, maxila posterior.

[#] O tipo de osso foi estabelecido a partir de radiografias e durante a osteotomia do sítio para instalação do implante, não sendo possível a obtenção dessa informação de todos os pacientes.

^{##} Perda do implante antes ou durante conexão do *abutment*.

TABELA 2

Características clínicas dos pacientes incluídos no grupo controle.

Paciente	Sexo	Idade	Implantes colocados	Região*	Tempo em função
C1	M	60	02	Max post	16 meses
C2	F	23	01	Max ant	51 meses
C3	M	21	01	Max ant	41 meses
C4	M	29	01	Max ant	18 meses
C5	M	55	05	Mand post	33 meses
C6	F	68	04	Max ant/post	29 meses
C7	M	25	02	Mand ant	20 meses
C8	F	48	02	Mand ant	47 meses
C9	F	37	02	Mand post	12 meses
C10	F	36	01	Mand post	21 meses
C11	F	56	04	Mand ant/post	13 meses
C12	F	48	02	Mand post	12 meses
C13	F	23	02	Max ant	18 meses
C14	F	52	03	Mand post	23 meses
C15	F	37	03	Mand post	12 meses
C16	F	42	02	Max ant	12 meses
C17	M	52	01	Max ant	20 meses
C18	M	45	02	Max ant	23 meses
C19	F	71	04	Max ant/post	18 meses
C20	M	57	04	Mand ant/post	42 meses
C21	M	48	03	Max post	56 meses
C22	M	37	02	Max ant	41 meses
C23	M	23	04	Mand ant/post	48 meses
C24	M	43	01	Max ant	43 meses
C25	M	33	03	Max ant/Mand post	24 meses
C26	F	34	01	Max post	27 meses
C27	F	50	03	Max ant	52 meses
C28	M	42	01	Mand post	34 meses
C29	F	26	02	Max ant	32 meses
C30	F	47	03	Max post	48 meses
C31	F	59	02	Mand post	65 meses
C32	F	44	01	Mand post	18 meses

*Mand ant, mandíbula anterior; Mand post, mandíbula posterior; Max ant, maxila anterior; Max post, maxila posterior.

Dentre os 121 implantes perdidos nas duas clínicas, foram selecionados apenas 25 pacientes que apresentaram 37 implantes com perda precoce, ou seja, esses implantes apresentaram mobilidade, radiolucidez periimplantar ou dor, durante o período de osseointegração, durante ou após a instalação do *abutment*, sendo indicada sua remoção imediata. Para minimizar a influência de outros fatores na perda do implante, foram

excluídos do estudo: pacientes fumantes, diabéticos, portadores de osteoporose, pacientes imunodeprimidos ou com história de exposição prévia à radioterapia ou quimioterapia e pacientes que se submeteram a técnicas regenerativas prévias ou concomitantes à instalação dos implantes, como enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada. Indivíduos negros ou mulatos foram excluídos do estudo para reduzir a heterogeneidade genética dos grupos analisados. Os pacientes incluídos no estudo assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FOP/UNICAMP (protocolo nº 006/2002) (ANEXO 1).

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL

O DNA dos pacientes de ambos os grupos foi extraído a partir de células epiteliais da mucosa oral. Essas células foram obtidas por meio de bochecho com glicose a 3% (1 min), seguido de leve raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira autoclavada. A solução foi centrifugada por 10 min a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 500 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA, 0,5% SDS) (Trevilatto & Line, 2000).

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 100 ng/mL de proteinase K (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*) a 37°C e sob agitação. O DNA foi então purificado utilizando-se a extração pela seqüência fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), seguido da precipitação com sal/etanol. O DNA foi ressuspendido em 70 µL de tampão TE (10 mM Tris (pH 7,8), 1 mM EDTA). A concentração do DNA foi estimada com o auxílio de um espectrofotômetro (*GeneQuant RNA/DNA Calculator – Pharmacia/Biotec*) em comprimento de onda de 260 nm (Maniattis *et al.*, 1989).

4.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

Com o auxílio de um termociclador convencional (*GeneAmp®PCR System 9600*), a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para a amplificação de fragmentos específicos dos genes da IL-1, IL-6 e TNF- α . Em seguida, foi utilizada a técnica de RFLP (polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição), na qual os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para a identificação dos alelos. Finalmente, o produto total do PCR/RFLP era misturado a 3 μ L de tampão de amostra e submetido à eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10 % (não desnaturante) sob corrente elétrica de 20 mA. Posteriormente, os géis foram corados pela prata (Sanguinetti *et al.*, 1994), possibilitando as análises que eram realizadas mediante comparação com padrão de massa molecular (*ϕ X-174-RF DNA Hae III digest*, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Os *primers*, condições de amplificação e restrição dos polimorfismos estudados estão descritos a seguir.

4.4.1 Análise do polimorfismo IL-1A (C-889T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'- AAGCTTGGTCTACCCACCTGAACTAGGC - 3' (*forward*)

5'-TTACATATGAGCCTTCCATG - 3' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μ L, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μ M de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq DNA polymerase*. As soluções foram incubadas a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentava 99 pb.

Após a reação de PCR, 12 μ L do produto amplificado foram digeridos por 0,2 μ L da enzima *NcoI* (10 U/ μ L – Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) em 13

μL de solução contendo 10,3 μL de H₂O destilada e desionizada, 2,5 μL de 10x *NE Buffer* (50 mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM *dithiothreitol* pH 7,9). A digestão foi realizada a 37°C *ON* para detecção do alelo C (16 pb + 83 pb) e do alelo T (99 pb) (Figura 1). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

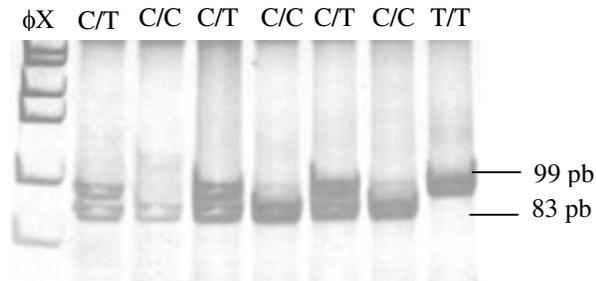


FIGURA 1. Gel de poliacrilamida corado por prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Nco* I) do polimorfismo IL-1A (C-889T). C/T, pacientes heterozigotos; C/C, pacientes homozigotos para o alelo C; T/T, pacientes homozigotos para o alelo T; φX, padrão de massa molecular.

4.4.2 Análise do polimorfismo IL-1B (C-511T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'- TGGCATTGATCTGGTTCATC - 3' (*forward*)

5'- GTTTAGGAATCTTCCCACTT - 3' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μM de cada *primer*, 200 μM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq* DNA *polymerase*. As soluções foram incubadas a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 56°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentava 304 pb.

Após a reação de PCR, 12 μL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 μL da enzima *Ava* I (10 U/μL – *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) em 13

μL de solução contendo 10,3 μL de H₂O destilada e desionizada, 2,5 μL 10x *NE Buffer* (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM *dithiothreitol* pH 7,9). A digestão foi realizada a 37°C *ON* para a detecção do alelo C (114 pb + 190 pb) e do alelo T (304 pb) (Figura 2). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

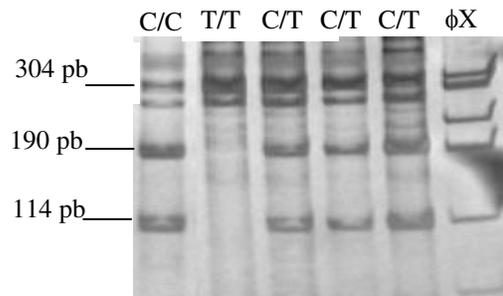


FIGURA 2. Gel de poliacrilamida corado por prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Ava* I) do polimorfismo IL-1B (C-511T). C/T, pacientes heterozigotos; C/C, paciente homozigoto para o alelo C; T/T, paciente homozigoto para o alelo T; φX, padrão de massa molecular.

4.4.3 Análise do polimorfismo IL-1B (C+3953T)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5' - CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA - 3' (*forward*)

5' - GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG – 3' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μM de cada *primer*, 200 μM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq* DNA *polymerase*. As soluções foram incubadas a 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 67,5°C (1 min) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C por 5 min. O fragmento amplificado apresentava 194 pb.

Após a reação de PCR, 12 μL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 μL da enzima *Taq* I (10 U/ μL – *Promega, Madison, WI, USA*) em 13 μL de solução contendo 10,3 μL de H_2O destilada e desionizada, 2,5 μL 10x *NE Buffer* (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM *dithiothreitol* pH 7,9). A digestão foi realizada a 65°C *ON* para a detecção do alelo C (85 pb + 97 pb + 12 pb) e do alelo T (182 pb +12 pb) (Figura 3). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

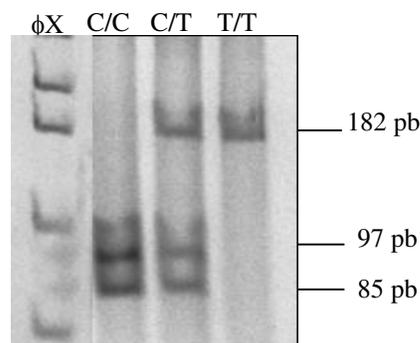


FIGURA 3. Gel de poliacrilamida corado por prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Taq* I) do polimorfismo IL-1B (C-511T). C/T, paciente heterozigoto; C/C, paciente homozigoto para o alelo C; T/T, paciente homozigoto para o alelo T; ϕX , padrão de massa molecular.

4.4.4 Análise do polimorfismo IL-1RN VNTR (intron 2)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' (forward)

5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL , contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μM de cada *primer*, 200 μM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq* DNA *polymerase*. As soluções foram incubadas a 96°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C (1 min), 60°C (1 min) e 70°C (1 min), e extensão final de

70°C por 3 min e 55°C por 3 min. A análise desse polimorfismo não foi realizada por enzima de restrição, pois o próprio produto da amplificação permitiu a identificação dos alelos: alelo 1 (412 pb – 4 repetições), alelo 2 (240 pb – 2 repetições), alelo 3 (326 pb – 3 repetições), alelo 4 (498 pb – 5 repetições) e alelo 5 (584 pb – 6 repetições) (Figura 4). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

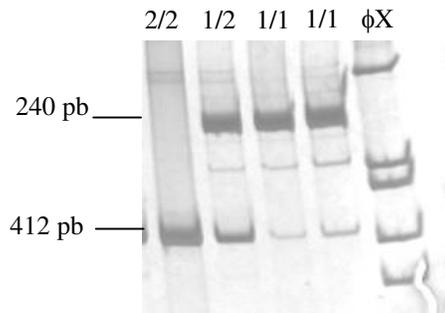


FIGURA 4. Gel de poli-acrilamida corado por prata, evidenciando amplificação do PCR do polimorfismo IL-1RN VNTR (intron 2). 1/2, paciente heterozigoto; 2/2, paciente homozigoto para o alelo 2; 1/1, pacientes homozigotos para o alelo 1; φX, padrão de massa molecular.

4.4.5 Análise do polimorfismo IL-6 (G-174C)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5'-TTGTCAAGACATGCCAAGTGCT-3' (*forward*)

5'-GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq DNA polymerase*. As soluções foram incubadas a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1 min), e por uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 299 pb.

Após a reação de PCR, 12 μL do produto amplificado foram digeridos por 0,2 μL da enzima *Hla* III (10 U/ μL – *Q-biogene, Inc. Carlsbad, CA, USA*) em 13 μL de solução contendo 10,3 μL de H_2O destilada e desionizada, 2,5 μL 10x *NE Buffer* (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM *dithiothreitol* pH 7,9). A digestão foi realizada a 37°C *ON* a para detecção do alelo G (227 pb + 59 pb + 13 pb) e do alelo C (118 pb + 109 pb + 59 pb + 13 pb) (Figura 5). Esta técnica foi baseada em Olomolaiye *et al.* (1998).

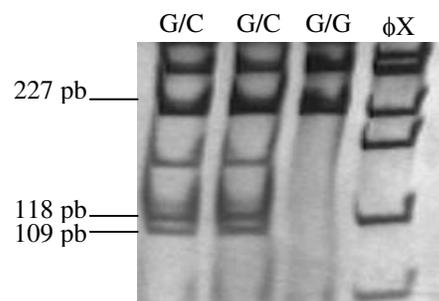


FIGURA 5. Gel de poliacrilamida corado por prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Hla* III) do polimorfismo IL-6 (G-174C). G/C, pacientes heterozigotos; G/G, paciente homozigoto para o alelo G; ϕX , padrão de peso molecular. Os fragmentos menores de DNA não são observados, pois saem do gel.

4.4.6 Análise do polimorfismo TNF-A (G-308A)

Foram utilizados os seguintes *primers*:

5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3' (*forward*)

3' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 5' (*reverse*)

A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL , contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 μM de cada *primer*, 200 μM de dNTPs e 2 unidades (U) de *Taq DNA polymerase*. As soluções foram incubadas a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C (1 min), 60°C (1 min) e 72°C (1 min), e por uma extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 107 pb.

Após a reação de PCR, 12 μL do produto amplificado foram digeridos por 0, 2 μL da enzima *Nco*I (10 U/ μL – *Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden*) em 13 μL de solução contendo 10,3 μL de H_2O destilada e desionizada, 2,5 μL 10x *NE Buffer* (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM *dithiothreitol* pH 7,9). A digestão foi realizada a 37°C *ON* para a detecção do alelo G (87 pb + 20 pb) e do alelo A (107 bp) (Figura 6). Este protocolo é uma modificação da técnica descrita por Kornman *et al.* (1997).

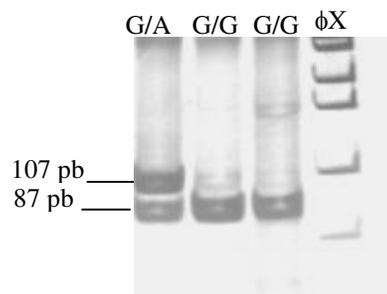


FIGURA 6. Gel de poliácridamida corado por prata, evidenciando resultado da RFLP (enzima *Nco* I) do polimorfismo TNF-A (G-308A). G/A, paciente heterozigoto; G/G, pacientes homozigotos para o alelo G; ϕX , padrão de massa molecular.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O equilíbrio de Hardy-Weinberg de cada polimorfismo estudado foi calculado tanto para o grupo teste como para o grupo controle, com o auxílio do programa ARLEQUIM (Schneider *et al.*, 2000) ou pelo teste proposto por (Guo & Thompson, 1992). O equilíbrio de Hardy-Weinberg determina a distribuição de homozigotos e heterozigotos de um polimorfismo em uma determinada população.

Para cada polimorfismo estudado, as frequências dos alelos e dos genótipos foram comparadas entre os grupos teste e controle, utilizando-se a simulação de Monte Carlo (programa CLUMP) (Sham & Curtis, 1995) ao nível de significância de 5%.

O fato dos genes da IL-1 se encontrarem próximos no mesmo cromossomo, sugere que sejam herdados em bloco, justificando a análise simultânea de seus polimorfismos como haplótipos. O programa ARLEQUIM (Schneider *et al.*, 2000) foi utilizado para determinar os possíveis haplótipos e calcular o desequilíbrio de ligação entre os *loci* polimórficos. A simulação de Monte Carlo foi utilizada para comparar as frequências haplotípicas entre os grupos teste e controle ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

Analisando-se idade e gênero dos indivíduos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados (Tabela 3). A avaliação das características clínicas do grupo teste revelou que 68% (17/25) dos pacientes apresentaram perdas antes da instalação do *abutment* e que a região posterior da mandíbula concentrou o maior número de falhas (52%) quando comparada às demais regiões da boca. Esses dados estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

TABELA 3

Distribuição do gênero e idade entre os indivíduos estudados.

	Grupo Controle (n=32)	Grupo Teste (n=25)	Valor de p
Gênero (%)			
<i>Feminino</i>	18 (56.25%)	14 (56%)	0.802
<i>Masculino</i>	14 (43.75%)	11 (44%)	
Idade média	42.8	49.6	
\pm DP* (<i>variação</i>)	13.4 (21-71)	12.6 (18-73)	

* \pm DP, desvio padrão.

TABELA 4

Distribuição do período da falha em relação à instalação do *abutment* entre os pacientes que apresentaram perda precoce de implantes.

	Antes da instalação do <i>abutment</i>	Durante a instalação do <i>abutment</i>	Após a instalação do <i>abutment</i>
Nº de pacientes com perda de implantes (n=25)	17 (68%)	3 (12%)	5 (20%)

TABELA 5

Distribuição das arcadas (superior e inferior) e regiões (anterior e posterior) entre os pacientes que apresentaram perda precoce de implantes.

	Mandíbula		Maxila	
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Nº de pacientes com perda de implantes (n=25)*	2 (8.3%)	13 (54.1%)	4 (16.6%)	5 (20.8%)

* Um paciente apresentou perda de implantes instalados na região anterior e posterior da mandíbula.

5.1 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA IL-1

Considerando os quatro polimorfismos da IL-1 de forma independentemente, a distribuição genotípica de todos mostrou-se estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo teste como no grupo controle, com exceção do polimorfismo IL-1B (C-511T) que não alcançou o equilíbrio esperado na população teste devido ao excesso de genótipos heterozigotos (frequência esperada 25% e frequência observada 49%, $p=0.015$).

As frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo analisado estão apresentadas na tabela 6. A comparação entre os grupos teste e controle não demonstrou significância estatística na frequência dos alelos ou dos genótipos.

O polimorfismo no intron 2 do gene IL-1RN apresenta cinco possíveis alelos, entretanto, na população estudada foram observados apenas os alelos 1, 2 e 4, sendo os alelos 1 e 2 os mais frequentes.

TABELA 6

Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T) e IL-1RN (intron 2) entre os grupos teste e controle.

	Grupo Controle n=32	Grupo Teste n=25	Valor de p
IL-1A (C-889T)			
<i>Alelo C</i>	44 (68.7%)	36 (72%)	0.84
<i>Alelo T</i>	20 (31.2%)	14 (28%)	
<i>Genótipo C/C</i>	17 (53.1%)	14 (56%)	0.92
<i>Genótipo T/T</i>	5 (15.6%)	3 (12%)	
<i>Genótipo C/T</i>	10 (31.2%)	8 (32%)	
IL-1B (C-511T)			
<i>Alelo C</i>	37 (57.8%)	31 (62%)	0.70
<i>Alelo T</i>	27 (42.1%)	19 (38%)	
<i>Genótipo C/C</i>	11 (34.3%)	13 (52%)	0.08
<i>Genótipo T/T</i>	6 (18.7%)	7 (28%)	
<i>Genótipo C/T</i>	15 (46.8%)	5 (20%)	
IL-1B (C+3953T)			
<i>Alelo C</i>	51 (79.6%)	38 (76%)	0.64
<i>Alelo T</i>	13 (20.3%)	12 (24%)	
<i>Genótipo C/C</i>	21 (65.6%)	16 (64%)	0.82
<i>Genótipo T/T</i>	2 (6.2%)	3 (12%)	
<i>Genótipo C/T</i>	9 (28.1%)	6 (24%)	
IL-1RN			
<i>Alelo 1</i>	44 (68.7%)	31 (62%)	0.77
<i>Alelo 2</i>	19 (29.6%)	18 (36%)	
<i>Alelo 4</i>	1 (1.5%)	1 (2%)	
<i>Genótipo 1/1</i>	15 (46.8%)	10 (40%)	0.76
<i>Genótipo 2/2</i>	2 (6.2%)	4 (16%)	
<i>Genótipo 1/2</i>	14 (43.7%)	10 (40%)	
<i>Genótipos raros</i>	1 (3.1%)	1 (4%)	

A análise de haplótipos dos polimorfismos da IL-1 apresentou a existência de 15 formas haplotípicas, entretanto, não se observou diferença estatística significativa quando as frequências dos haplótipos foram comparadas entre os grupos teste e controle (Tabela 7).

TABELA 7

Distribuição das frequências dos haplótipos dos polimorfismos IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T) e IL-1RN (intron 2) entre os grupos teste e controle.

Haplótipos IL-1RN / IL-1A(-889) / IL-1B(-511) / IL- B(+3953)	Grupo Controle n=32	Grupo Teste n=25	Valor de p
1CCC	20 (31.25%)	13 (26%)	p=0.088
1CCT	3 (4.6%)	3 (6%)	
1CTC	1 (1.5%)	3 (6%)	
1CTT	7 (10.9%)	4 (8%)	
1TCC	11 (17.1%)	7 (14%)	
1TCT	2 (3.1%)	1 (2%)	
1TTT	1 (1.5%)	1 (2%)	
2CCC	5 (7.8%)	6 (12%)	
2CCT	1 (1.5%)	1 (2%)	
2TCC	6 (9.3%)	7 (14%)	
2TTC	1 (1.5%)	0	
2TTT	2 (3.1%)	3 (6%)	
2TCT	3 (4.6%)	0	
4CTT	0	1 (2%)	
4TTT	1 (1.5%)	0	

Os *loci* polimórficos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) se mostraram em forte desequilíbrio de ligação no grupo teste (p=0.0238) e no grupo controle (p=0.00014). Este fato justificou a análise da distribuição do genótipo composto pelos alelos T dos

polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) entre os pacientes do grupo controle e do grupo teste, entretanto, não se observou diferença estatisticamente significativa (Tabela 8).

TABELA 8

Distribuição da frequência do genótipo composto, constituído pelos alelos T dos polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T), entre os indivíduos dos grupos teste e controle.

	Grupo Controle n=32	Grupo teste n=25	Valor de p
Genótipo composto	9 (28.1%)	8 (32%)	p=0.779
Outros genótipos	23 (71.8%)	17 (68%)	

5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO IL-6 (G-174C)

A distribuição genotípica do polimorfismo da IL-6 alcançou o equilíbrio de Hardy-Weinberg apenas no grupo teste. No grupo controle não foi observado o equilíbrio esperado devido ao excesso de genótipos heterozigotos (frequência esperada 40% e frequência observada 55%, $p=0.020$).

Não se observou diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genotípicas quando os dois grupos foram comparados (Tabela 9). O alelo C apresentou baixa frequência na população, ocorrendo apenas um paciente com o genótipo C/C.

TABELA 9

Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo IL-6 (G-174C) entre os indivíduos dos grupos teste e controle.

	Grupo Controle N=32	Grupo Teste n=25	Valor de p
IL-6 (G-174C)			
<i>Alelo C</i>	19 (29.6%)	16 (32%)	0.85
<i>Alelo G</i>	45 (70.3%)	34 (68%)	
<i>Genótipo C/C</i>	0	1 (4%)	
<i>Genótipo G/G</i>	13 (40.6%)	10 (40%)	0.56
<i>Genótipo C/G</i>	19 (59.3%)	14 (56%)	

5.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO TNF-A (G-308A)

A distribuição genotípica do polimorfismo alcançou o equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos estudados.

As frequências alélicas e genotípicas também não mostraram diferença estatística significativa quando os grupos teste e controle foram comparados (Tabela 10). O alelo A apresentou baixa frequência (4.6%) na população e o genótipo A/A não ocorreu em nenhum dos pacientes analisados.

TABELA 10

Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo TNF-A (G-308A) entre os indivíduos dos grupos teste e controle.

	Grupo Controle n=32	Grupo Teste n=25	Valor de p
TNF-A (G-308A)			
<i>Alelo A</i>	3 (4.6%)	2 (4%)	1.00
<i>Alelo G</i>	61 (95.3%)	48 (96%)	
<i>Genótipo A/A</i>	0	0	
<i>Genótipo G/G</i>	29 (90.6%)	23 (92%)	1.00
<i>Genótipo G/A</i>	3 (9.3%)	2 (8%)	

6. DISCUSSÃO

Apesar de não ser um evento freqüente, o insucesso dos implantes endósseos pode ocorrer independentemente da experiência do cirurgião, frustrando as expectativas do profissional e, principalmente, do paciente. As causas da falha do processo de osseointegração, observada na perda precoce de implantes, ainda não estão completamente estabelecidas. A literatura aponta diversos fatores que podem influenciar a resposta cicatricial periimplantar. Em suma, o estabelecimento de uma osseointegração adequada parece ser resultado de um sutil balanço entre boa estabilização primária (relacionada à quantidade e qualidade óssea favoráveis), mínima injúria ao tecido, resposta eficiente do hospedeiro e superfície do implante biologicamente aceitável (Friberg *et al.*, 1991; Hutton *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1998b; Ekfeldt *et al.*, 2001; van Steenberghe *et al.*, 2002).

No presente estudo não se observou influência do gênero ou idade sobre a perda precoce dos implantes. Apesar de alguns estudos associarem a perda precoce à idade avançada do paciente (Salonen *et al.*, 1993), nossos resultados concordam com a maioria dos achados na literatura (Hutton *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1998b; Wilson & Nunn, 1999; Ekfeldt *et al.*, 2001) de que a idade não aumenta o risco à perda de implantes.

Analisando-se a perda dos implantes em relação ao período de instalação do *abutment*, observou-se que 68% (17/25) dos pacientes do grupo teste apresentaram falhas antes da sua instalação, enquanto que, em 12% (3/25) e em 20% (5/25) dos pacientes as falhas ocorreram durante e após a conexão do *abutment*, respectivamente. Friberg *et al.* (1991), analisando 69 implantes com perda precoce, observaram que a maioria (48/69) das falhas foi diagnosticada durante a conexão do *abutment* e 17 implantes foram perdidos após a conexão. Estes achados sugerem que demasiada força durante a instalação do *abutment* pode ter provocado a ruptura de uma frágil interface osso-implante ou que contatos acidentais entre o implante e o dente oposto podem ter gerado sobrecarga traumática. El Askari *et al.* (1999b) também atribuíram o insucesso diagnosticado durante a instalação do *abutment* ao excesso de torque em implantes instalados em osso tipo IV.

Maxilares reabsorvidos em combinação com osso tipo I e IV podem ser considerados situações de risco para a perda precoce de implante. Em maxilares com alta densidade óssea (osso tipo I), o superaquecimento do sítio cirúrgico poderá ocorrer se uma irrigação apropriada não for fornecida, enquanto que, em maxilares de pobre qualidade óssea (osso tipo IV) ocorre dificuldade em se estabelecer a estabilidade primária do implante (Friberg *et al.*, 1991). No presente estudo, não foi possível obter a informação da qualidade óssea de todos os maxilares. Entretanto, como a maioria dos pacientes do grupo teste perderam implantes instalados na região posterior da mandíbula (54.1%), pode-se suspeitar que o volume e qualidade óssea nessa região tenham desempenhado algum papel na falha dos implantes. A camada cortical da mandíbula geralmente é densa e espessa e tende a se tornar mais estreita e porosa na região posterior, o mesmo ocorre com sua porção trabecular que é mais densa quando comparada à maxila e também se apresenta mais porosa na região posterior. Além disso, a presença do canal mandibular limita o volume ósseo disponível na região posterior da mandíbula (Esposito *et al.*, 1998b).

Tanto nos pacientes do grupo teste, como nos pacientes do grupo controle, os implantes instalados eram usinados, tipo parafuso e sem tratamento de superfície, independente da marca comercial utilizada (3i ou Conexão). Portanto, neste estudo torna-se impossível avaliar se o formato ou a superfície do implante desempenharam algum papel na perda precoce nos pacientes do grupo teste.

A concentração da perda de implantes em um pequeno grupo de indivíduos (Weyant & Burn, 1993; Hutton *et al.*, 1995; Ekfeldt *et al.*, 2001) indica que a resposta deficiente do hospedeiro pode ser o ponto de partida para o melhor entendimento das falhas no processo de osseointegração. Algumas características do hospedeiro como fumo severo, exposição à quimioterapia e radioterapia, diabetes e osteoporose podem implicar em risco à perda precoce de implantes (Ekfeldt *et al.*, 2001; van Steenberghe *et al.*, 2002). Entretanto, poucos estudos têm se preocupado em avaliar a possível influência de fatores genéticos nesses insucessos.

Dentre os eventos que participam da regeneração periimplantar, a produção de fatores locais, como citocinas e fatores de crescimento, parece ser o ponto crucial para a definição entre o estabelecimento da osseointegração e a formação da cápsula fibrosa que resultará na perda precoce do implante (Schwartz *et al.*, 1999). Os implantes dentais parecem induzir, nos tecidos do hospedeiro, um padrão de produção de citocinas que favorece a osseointegração ao invés da rejeição (Schiareno *et al.* 2000). Entretanto, a secreção excessiva de citocinas com atividade osteoclástica, como a IL-1, IL-6 e TNF- α , poderia perturbar esse equilíbrio, resultando em uma resposta biológica desfavorável ao estabelecimento e/ou manutenção da osseointegração.

O presente estudo parece ser o primeiro a analisar a correlação entre polimorfismos funcionais nos genes da IL-1, IL-6 e TNF- α e a perda precoce de implantes. Os resultados não revelaram correlação significativa entre as frequências alélicas ou genotípicas dos seis polimorfismos estudados, bem como entre os haplótipos da IL-1, quando os grupos controle e teste foram comparados.

Uma possibilidade para os resultados negativos aqui apresentados pode ser o limitado número de indivíduos analisados. Na tentativa de avaliar o real papel dos polimorfismos na perda precoce, foram estabelecidos rígidos critérios de exclusão para minimizar ao máximo a influência de outros fatores como o fumo, condições sistêmicas do paciente e complicações operatórias. A seleção dos pacientes baseada nesses critérios diminuiu muito o número amostral. Entretanto, a quantidade de indivíduos do grupo teste (n=25) não diferiu muito do número de pacientes analisados em estudos prévios, cujos critérios de exclusão não foram tão rígidos: 27 indivíduos, incluindo perdas precoces e tardias e pacientes fumantes (Wilson & Nunn, 1999), e 19 indivíduos com perda tardia, cujos critérios de inclusão e exclusão não foram mencionados (Rogers *et al.*, 2002).

Em 1999, Wilson & Nunn não observaram correlação entre o genótipo composto pelos alelos T dos polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) e a perda de implantes. Foram incluídos no mesmo grupo pacientes com perdas precoces e tardias, além de pacientes fumantes. O fumo demonstrou aumentar 2.5 vezes o risco à perda de

implantes e os autores sugeriram que o efeito do fumo pode ter mascarado a influência do genótipo sobre a perda dos implantes. Rogers *et al.* (2002) também não observaram associação significativa entre esse genótipo composto e a perda tardia de implantes.

Recentemente, Shimpuku *et al.* (2003) avaliaram os polimorfismos IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T) e IL-1B (C+3953T) em 39 pacientes que apresentaram perda óssea periimplantar precoce e idiopática. Apenas o genótipo T/T do polimorfismo IL-1B (C-511T) demonstrou correlação significativa. O gênero, idade, fumo, qualidade óssea, período pós-menopausa e os demais polimorfismos estudados não apresentaram correlação estatística significativa. Os autores sugeriram que os polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T), uma vez que estariam associados à severidade da doença periodontal (Kornman *et al.*, 1997), devem ter maior relevância como marcadores para a perda óssea de etiologia infecciosa. No presente estudo, a ausência de correlação entre os polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) e a perda precoce pode ser consequência da ausência de etiologia infecciosa nos insucessos analisados.

Alguns estudos têm demonstrado que polimorfismos da IL-1 realmente têm efeito sobre a taxa de transcrição gênica. Entretanto, esse fenômeno não é tão simples, pois os polimorfismos não parecem atuar de forma individual e sim em cooperação. Portanto, torna-se necessária a análise destes polimorfismos em haplótipos. Recentemente, foi demonstrado desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos IL-1RN (intron 2) e IL-1B (C-511T) (Joos *et al.*, 2001). Hurme & Santtila (1998) observaram que em indivíduos saudáveis, o alelo 2 do polimorfismo IL-1RN (intron 2) estava associado a elevados níveis plasmáticos de IL-1ra apenas quando o alelo T do polimorfismo IL-1B (C-511T) também estava presente. Em um estudo *in vitro*, células mononucleares com o alelo 2 do polimorfismo IL-1RN (intron 2) produziram elevados níveis de IL-1 β (Santtila *et al.*, 1998).

No presente estudo, a frequência haplotípica da IL-1 e a distribuição do genótipo composto (alelos T dos polimorfismos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T)) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos controle e teste. No entanto,

observou-se forte desequilíbrio de ligação entre os *loci* polimórficos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T). Isto significa que deve ocorrer uma associação não aleatória dos alelos destes dois *loci*, logo, eles não devem ser analisados de forma independente. Gore *et al.* (1998) também observaram desequilíbrio de ligação entre esses dois *loci* polimórficos em americanos caucasóides saudáveis e com doença periodontal. Outro estudo confirmou este desequilíbrio de ligação em americanos caucasóides, entretanto, o mesmo não foi observado quando indivíduos afro-americanos foram analisados (Diehl *et al.*, 1999). O forte desequilíbrio de ligação observado neste estudo está de acordo com estudos prévios (Gore *et al.*, 1998; Diehl *et al.*, 1999) e pode ser reflexo da exclusão de indivíduos negros e mulatos dos grupos amostrais.

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a correlação entre os polimorfismos IL-6 (G-174C) e TNF-A (G-308A) e a perda precoce de implantes. Não foram observadas diferenças significantes nas frequências alélicas e genotípicas quando os grupos teste e controle foram comparados.

Terry *et al.* (2000) compararam a influência do polimorfismo IL-6 (G-174C), atuando individualmente e em combinação com outros 3 polimorfismos na região promotora deste gene, sobre a transcrição em dois tipos celulares (células tipo epitelial e tipo endotelial). Observou-se que a regulação da transcrição gênica da IL-6 é específica para o tipo celular e este fato deve ser considerado no estudo genético de diferentes patologias. Diferenças na transcrição da IL-6 resultaram de diferentes haplótipos e não do efeito individual do polimorfismo IL-6 (G-174C). Os autores concluíram que polimorfismos em sítios distintos atuam de forma interdependente, portanto, apenas a análise do polimorfismo IL-6 (G-174C) sobre a suscetibilidade a doenças torna-se inadequado.

Assim como no gene da IL-6, outros polimorfismos foram descritos no gene TNF-A e alguns deles se mostraram em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo aqui estudado (Perry *et al.*, 2001). Esses polimorfismos também parecem se relacionar com elevada produção de TNF- α e foram associados a algumas doenças, como doença de

Alzheimer (Perry *et al.*, 2001), doença periodontal (Soga *et al.*, 2003) e esclerose múltipla (Huizinga *et al.*, 1997).

Com base nos resultados do presente estudo, não se pode concluir que polimorfismos nos genes da IL-6 e TNF- α não se relacionam com a perda precoce de implantes. Futuramente, a análise de outros polimorfismos nestes genes, combinados em haplótipos, fornecerá a real influência destas variações genéticas sobre o estabelecimento da osseointegração.

Diversas outras citocinas e fatores de crescimento participam da resposta inflamatória aguda, do processo de regeneração e de reparo (Abbas *et al.*, 1998). Talvez a formação da cápsula fibrosa ao redor dos implantes com perda precoce tenha maior influência de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator transformador do crescimento (TGF), do que das citocinas pró-inflamatórias aqui estudadas. Isso poderia ser uma possível explicação para os resultados negativos deste trabalho. A propriedade de indução da reabsorção óssea demonstrada pela IL-1, IL-6 e TNF- α e a presença de IL-1 β no fluido crevicular de implantes infeccionados (Kao *et al.*, 1995; Panagakos *et al.*, 1996; Curtis *et al.*, 1997; Aboyoussef *et al.*, 1998) sugerem que estas citocinas, bem como seus polimorfismos, podem ter maior relevância na perda tardia dos implantes, principalmente nos casos de periimplantite.

Nas últimas décadas, um dos avanços mais significativos na medicina foi a capacidade de se calcular o risco a doenças (Tonetti, 1998). Na odontologia, esse processo já vem sendo observado, principalmente em relação à doença periodontal, na qual pacientes portadores de determinados hábitos e características, incluindo o perfil genético, vêm sendo identificados como indivíduos com maior propensão ao desenvolvimento de periodontite em grau severo. Na implantodontia, a existência de indivíduos que apresentam múltiplas perdas de implantes indica que certos fatores ou características específicas estão associados à maior probabilidade do insucesso de implantes.

A perda precoce de implantes parece ser o resultado de um processo multifatorial que ainda não está completamente esclarecido. É evidente que células e mediadores inflamatórios contribuem para o encapsulamento fibroso do implante, evidenciado nesses insucessos. Entretanto, pesquisas futuras são necessárias para a identificação dos fatores clínicos e moleculares determinantes neste fenômeno. A partir dessas informações, a investigação de fatores genéticos poderá identificar indivíduos com características que predisponham à perda precoce de implantes, possibilitando ao profissional adequada seleção do paciente, melhor planejamento do caso e estabelecimento de prognóstico seguro. Isto permitirá o aumento do índice de sucesso dos implantes, tornando esta alternativa de tratamento cada mais previsível e confiável.

7. CONCLUSÃO

Os *loci* polimórficos IL-1A (C-889T) e IL-1B (C+3953T) se mostraram em forte desequilíbrio de ligação em ambos os grupos analisados, sugerindo que ocorre a segregação destes *loci* durante a divisão celular e, portanto, não podem ser considerados de forma independente.

Os achados do presente estudo sugerem que os polimorfismos IL-1A (C-889T), IL-1B (C-511T), IL-1B (C+3953T) e IL-1RN VNTR (intron 2), analisados individualmente ou em haplótipos, não apresentam correlação com a perda precoce de implantes endósseos na população estudada.

Os polimorfismos IL-6 (G-174C) e TNF-A (G-308A) não mostraram estar associados à perda precoce de implantes na população brasileira estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.

Aboyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13(5): 689-696.

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990; 5(4): 347-359.

Aguillon JC, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. Tumor necrosis factor alpha genetic polymorphism as a risk factor in disease. *Rev Med Chil*. 2002; 130(9): 1043-1050.

Albrektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent*. 1988; 60(1): 75-84.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986; 1(1): 11-25.

Baier RE, Meyer AE. Implant surface preparation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1988; 3(1): 9-20.

Bain CA. Smoking and implant failure--benefits of a smoking cessation protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11(6): 756-759.

Blakemore AI, Cox A, Gonzalez AM, Maskil JK, Hughes ME, Wilson RM, *et al*. Interleukin-1 receptor antagonist allele (IL1RN*2) associated with nephropathy in diabetes mellitus. *Hum Genet*. 1996; 97(3): 369-374.

* Baseada no modelo Vancouver.

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2): 81-100. *Apud* Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da Osseointegração. In: Gomes LA. *Implantes osseointegrados. Técnica e arte*. São Paulo: Santos; 2002. p. 1-9.

Campos Júnior A, Passanezi E. Porque a osseointegração revolucionou a implantodontia? In: Todescan FF, Bottino MA. *Atualização na clínica odontológica: a prática da clínica geral*. São Paulo: APCD/Artes Médicas; 1996. p. 249-297.

Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da Osseointegração. In: Gomes LA. *Implantes osseointegrados. Técnica e arte*. São Paulo: Santos; 2002. p. 1-9.

Combarros O, Sanchez-Guerra M, Infante J, Llorca J, Berciano J. Gene dose-dependent association of interleukin-1A [-889] allele 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *J Neurol*. 2002; 249(9): 1242-1245.

Cork MJ, Crane AM, Duff GW. Genetic control of cytokines. Cytokine gene polymorphisms in alopecia areata. *Dermatol Clin*. 1996; 14(4): 671-678.

Cox JF, Zarb GA. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987; 2(2): 91-100.

Curtis DA, Kao R, Plesh O, Finzen F, Franz L. Crevicular fluid analysis around two failing dental implants: a clinical report. *J Prosthodont*. 1997; 6(3): 210-214.

Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995; 99(2): 303-310.

Deas DE, Mikotowicz JJ, Mackey SA, Moritz AJ. Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. *Implant Dent*. 2002; 11(3): 235-242.

De Lorenzo JL, Simionato MRL, De Lorenzo A. Infecção: principal causa de insucessos em implantes dentários. *Rev ABO Nac*. 1997; 5(6): 321-324.

Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, *et al.* Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1999; 70(4): 418-430.

di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet.* 1992; 1(6): 450.

Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988; 2(2): 108-115.

Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Linden U, Lundqvist S, Rundcrantz T, *et al.* A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(5): 462-467.

El Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part I. *Implant Dent.* 1999a; 8(2): 173-185.

El Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part II. *Implant Dent.* 1999b; 8(3): 265-277.

Esposito M, Thomsen P, Molne J, Gretzer C, Ericson LE, Lekholm U. Immunohistochemistry of soft tissues surrounding late failures of Branemark implants. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8(5): 352-366.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998a; 106(1): 527-551.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998b; 106(3): 721-764.

Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Lekholm U. Histopathologic observations on early oral implant failures. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999a; 14(6): 798-810.

Esposito M, Lausmaa J, Hirsch JM, Thomsen P. Surface analysis of failed oral titanium implants. *J Biomed Mater Res.* 1999b; 48(4): 559-568.

Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Burgin W, Bragger U, Buser D, *et al.* IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(1): 10-17.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102(7): 1369-1376.

Friberg B, Jemt T, Lekholm U Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991; 6 (2): 142-146.

Gore EA, Sanders JJ, Pandey JP, Palesch Y, Galbraith GM. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(10): 781-785.

Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992; 48(2): 361-372.

Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JÁ, *et al.* TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997; 72(2): 149-153.

Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol.* 1998; 28(8): 2598-2602.

Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, *et al.* Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995; 10(1): 33-42.

Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, *et al.* Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2002; 123(6): 1793-1803.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(4-5): 357-368.

Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol*. 1991; 62(1): 2-4.

Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE, *et al.* Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *J Periodontol*. 1991; 62(1): 36-43.

Joos L, McIntyre L, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Weir TD, *et al.* Association of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist haplotypes with rate of decline in lung function in smokers. *Thorax*. 2001; 56(11): 863-866.

Kao RT, Curtis DA, Richards DW, Preble J. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995; 10(6): 696-701.

Karjalainen J, Nieminen MM, Aromaa A, Klaukka T, Hurme M. The IL-1beta genotype carries asthma susceptibility only in men. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109(3): 514-516.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997; 24(1): 72-77.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997; 34(5): 391-399.

Kronström M, Svensson B, Erickson E, Houston L, Braham P, Persson GR. Humoral immunity host factors in subjects with failing or successful titanium dental implants. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(12): 875-882.

Lambert PM, Morris HF, Ochi S. Positive effect of surgical experience with implants on second-stage implant survival. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(12 Suppl 5): 12-18.

Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Linden U, Bergstrom C, *et al.* Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(5): 639-645.

Lima JHC, Elias CN, Meirelles LA. A osseointegração em diferentes tipos de superfície dos implantes osseointegráveis. In: Cardoso RJA, Machado MEL. *21º CIOSP – Vol 3 Dentística/Prótese/ATM/Implantodontia/Odontogeriatrics.* São Paulo: APCD/Artes Médicas; 2003. p. 353-365.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113(3): 401-406.

Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, *et al.* Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology.* 2001; 121(4): 823-829.

Magini RS, Schiochett C. Históricos dos implantes: do sonho à realidade. *Rev Bras Odontol.* 1999; 56(5): 245-251.

Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol.* 1998; 59(9): 571-579.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21(2): 115-137.

Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990; 25(3): 156-163.

McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(2): 221-228.

McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol.* 1998; 69(8): 865-871.

Meyle, J. Cell adhesion and spreading on different implant surfaces. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology: Implant Dentistry.* 1st ed. Chicago: Quintessence Publishing; 1999. p. 55-72.

Morris HF, Manz MC, Tarolli JH. Success of multiple endosseous dental implant designs to second-stage surgery across study sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(12 Suppl 5): 76-82.

Muller-Steinhardt M, Hartel C, Muller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 -174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival. *Kidney Int.* 2002; 62(5): 1824-1827.

Nicklin MJ, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics.* 1994; 19(2): 382-384.

Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet.* 1998; 25(2-3): 267.

Panagakos FS, Aboyoussef H, Dondero R, Jandinski JJ. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11(6): 794-799.

Perala D, Chapman R, Gelfand J. Complement activation by dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991; 6(2): 136-141.

Perala DG, Chapman RJ, Gelfand JA, Callahan MV, Adams DF, Lie T. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J Periodontol*. 1992; 63(5): 426-430.

Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6): 873-883.

Piattelli A, Scarano A, Dalla Nora A, De Bona G, Favero GA. Microscopical features in retrieved human Branemark implants: a report of 19 cases. *Biomaterials*. 1998a; 19(7-9): 643-649.

Piattelli A, Piattelli M, Mangano C, Scarano A. A histologic evaluation of eight cases of failed dental implants: is bone overheating the most probable cause? *Biomaterials*. 1998b; 19(7-9): 683-690.

Pietruski JK, Pietruska MD, Stokowska W, Pattarelli GM. Serum levels of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in patients treated with dental implants. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2001; 46: 28-37.

Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*. 1992; 22(6): 396-402.

Pola R, Flex A, Gaetani E, Lago AD, Gerardino L, Pola P, *et al*. The -174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with Alzheimer's disease in an Italian population. *Neuroreport*. 2002; 13(13): 1645-1647.

Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994; 65(5): 423-428.

Revilla M, Obach V, Cervera A, Davalos A, Castillo J, Chamorro A. A -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene in patients with lacunar infarction. *Neurosci Lett.* 2002; 324(1): 29-32.

Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ, *et al.* Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontal Res.* 2002; 37(1): 37-41.

Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, Smith FW, Collins JG, Socransky SS, *et al.* The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(1): 32-42.

Salonen MA, Oikarinen K, Virtanen K, Pernu H. Failures in the osseointegration of endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993; 8(1): 92-97.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17(5): 914-921.

Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. *Scand J Immunol.* 1998; 47(3): 195-198.

Schierano G, Bassi F, Gassino G, Mareschi K, Bellone G, Preti G. Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. *J Dent Res.* 2000; 79(9): 1675-1682.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *ARLEQUIM ver. 2000: a software for population genetic data analysis.* Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.

Schwartz-Arad D, Samet N, Samet N, Mamlider A. Smoking and complications of endosseous dental implants. *J Periodontol.* 2002; 73(2): 153-157.

Schwartz Z, Lohmann CH, Cochran DL, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Bone regulating mechanisms on implant surfaces. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology: Implant Dentistry.* 1st ed. Chicago: Quintessence Publishing; 1999. p. 41-54.

Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. *J Periodontal Res.* 1997; 32(1 Pt 2): 166-171.

Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet.* 1995; 59(1): 97-105.

Shida J, Trindade MC, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2000; 67(2): 151-155.

Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(4): 423-429.

Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res.* 2000; 79(11): 1864-1869.

Sim E. *Humoral Factors. The natural immune system.* 1st ed. New York: Oxford University Press; 1993.

Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosthet Dent.* 1989; 62(5): 567-572.

Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs)

are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol.* 2003; 30(6): 524-531.

Spyrou P, Papaioannou S, Hampson G, Brady K, Palmer RM, McDonald F. Cytokine release by osteoblast-like cells cultured on implant discs of varying alloy compositions. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13(6): 623-630.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991; 62(8): 504-509.

Takamatsu M, Yamauchi M, Maezawa Y, Saito S, Maeyama S, Uchikoshi T. Genetic polymorphisms of interleukin-1beta in association with the development of alcoholic liver disease in Japanese patients. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95(5): 1305-1311.

Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, *et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet.* 1993; 91(4): 403-404.

Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol.* 1993; 64(5): 416-431.

Tehemar SH. Factors affecting heat generation during implant site preparation: a review of biologic observations and future considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(1): 127-136. *Apud* Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da Osseointegração. In: Gomes LA. *Implantes osseointegrados. Técnica e arte.* São Paulo: Santos; 2002. p. 1-9.

Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000; 275(24): 18138-18144.

Tonetti MS. Risk factors for osseodisintegration. *Periodontol 2000.* 1998;17:55-62.

Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000; 18(1): 6-9.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB Jr, de Souza AP, Line SR. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003; 30 (5): 438-442.

Truhlar RS, Morris HF, Ochi S, Winkler S. Second-stage failures related to bone quality in patients receiving endosseous dental implants: DICRG Interim Report No. 7. *Implant Dent.* 1994; 3(4): 252-255.

Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995; 66(10): 852-859.

Tsutsui T, Kawaguchi H, Fujino A, Sakai A, Kaji H, Nakamura T. Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *J Orthop Sci.* 1999; 4(1): 32-38.

van Steenberghe D, Lekholm U, Bolender C, Folmer T, Henry P, Herrmann I, *et al.* Applicability of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a prospective multicenter study on 558 fixtures. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1990; 5(3): 272-281.

van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the *abutment* stage. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13(6): 617-622.

Vozarova B, Fernandez-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, *et al.* The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet.* 2003; 112(4): 409-413.

Westphal GA, Schnuch A, Moessner R, Konig IR, Kranke B, Hallier E, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2003; 48(2): 93-98.

Weyant RJ, Burt BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *J Dent Res.* 1993; 72(1): 2-8.

Wilson AG, Di Giovine FS, Blakemore AI, *et al.* Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1(5): 353.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(7): 3195-3919.

Wilson TG Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol.* 1999; 70(7): 724-729.

Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(1): 82-85.

ANEXO 1

ANEXO 2

Artigo submetido à revista *Journal of Clinical Periodontology*.

**EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN IL-1 GENE CLUSTER POLYMORPHISMS
AND EARLY IMPLANT FAILURE IN NON-SMOKING PATIENTS**

Campos M.I.G., Santos M.C.L.G., Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Bezerra F.J.B.,
Line S.R.P.

Maria I. G. Campos

MS, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Maria C. L. G. Santos

MS, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Paula C. Trevilatto

PHD, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC-PR), Curitiba,
PR, Brazil.

Raquel M. Scarel-Caminaga

PHD, University of the Sacred Heart, Bauru, SP, Brazil.

Fábio J. B. Bezerra

Private Practice in Periodontics, Salvador, BA, Brazil.

Sergio R. P. Line

PHD, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Running title: IL-1 polymorphisms and implant failure

Corresponding author:

Sergio R. P. Line

Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP

Departamento de Morfologia

Av. Limeira, 901, CEP 13414-903, CP 52, Piracicaba-SP, Brazil,

Phone: +55-019-34125333 Fax: +55-019-34125218

e-mail: serglin@fop.unicamp.br

Key words: IL-1 gene polymorphism, implant failure, osseointegration.

Campos M.I.G., Santos M.C.L.G., Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Bezerra F.J.B.,
Line S.R.P.

**EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN IL-1 GENE CLUSTER POLYMORPHISMS
AND EARLY IMPLANT FAILURE IN NON-SMOKING PATIENTS** (*Clin Oral Implant Res*)

Abstract

Objective: The aim of the present study was to investigate the relationship between specific polymorphisms of the IL-1 gene cluster and the early failure of osseointegrated implants.

Material and methods: The subject population was composed by a test group comprising 28 non-smokers patients (mean age 52.7) that had suffered one or more early implant failures and by a control group consisting of 34 individuals (mean age 43.3) with one or more healthy implants. Genomic DNA from buccal mucosa was amplified by the polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and submitted to polyacrylamide gel electrophoresis to distinguish the alleles of the IL-1A (-889), IL-1B (+3953), IL-1B (-511) and IL-RN (intron 2) gene polymorphisms. Differences in the allele and genotype frequencies between control and test groups were assessed by Chi-square test or by Monte Carlo simulations ($p < 0.05$). Haplotype frequencies, linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg equilibrium were also estimated.

Results: No statistically significant differences were found in the genotype distribution or allelic frequencies of the polymorphisms. No differences were observed between control and test groups when different IL-1 gene cluster haplotypes were compared. Nevertheless, the IL-1A (-889) and IL-1B (+3953) polymorphic sites were in strong linkage disequilibrium ($p = 0.00014$ for control group and $p = 0.0238$ for the test group).

Conclusion: This study suggests that polymorphisms in the IL-1 gene cluster are not associated with early implant failure in a non-smoking Brazilian population.

Introduction

Despite of the high success rates showed by osseointegrated implants (Lekholm et al. 1999; Adell et al. 1990; Listgarten et al. 1991), failures may occasionally occur. Regarding the timing of failure, it can be classified as early when osseointegration fails to occur, or late when the achieved osseointegration is lost after a period of function (Esposito et al. 1998a).

Infection, overheating, premature loading and impaired healing are the main factors associated with early failure of dental implants (Esposito et al. 1998b). However, in some situations, clinical factors alone do not explain why some patients develop this kind of loss (Deas et al. 2002). The knowledge that implant failure tends to cluster in subsets of individuals (Weyant & Burt 1993; Hutton et al. 1995) may indicate that there could be specific host characteristics that disturb the osseointegration process, like genetic factors (Santos et al. 2002). Implant success is directly related to the osseointegration stability. Bone is a dynamic tissue continuously remodeled through resorption and formation (Parfitt 1994), controlled by local production of cytokines, such as interleukins (ILs) (Tatakis 1993).

The IL-1 gene cluster has been mapped to the long arm of chromosome 2 and consists of three genes: IL-1A, IL-1B and IL-1RN, encoding IL-1 α , IL-1 β and IL-1ra, respectively (Nicklin et al. 1994). These cytokines are believed to play a key role in inflammation and immunologic reactions. IL-1 α and IL-1 β have several pro-inflammatory activities (Dinarello 1991), causing strong stimulatory effects on bone resorption and inhibitory effects on bone formation (Tatakis 1993; Stashenko et al. 1987; Nguyen et al. 1991). IL-1ra is a natural antagonist of both IL-1 α and IL-1 β , acting by binding the IL-1 receptors inhibiting biological response (Lennard 1995).

Some polymorphisms, which are genetic variations considered biologically normal, have been identified in the IL-1 genes. In the IL-1RN gene there are variable numbers of an 86 base pair (bp) repeat sequence, resulting in five different alleles, two of which, allele 1 (four repeats) and allele 2 (two repeats) are the most frequent (Tarlow et al. 1993). In the IL-1B gene, two biallelic base-exchange polymorphisms were described: at position -511 (C \rightarrow T) (Di Giovine et al. 1992) and at position +3953 (C \rightarrow T) (Pociot et al. 1992). In the IL-1A gene, a biallelic base-exchange polymorphism at position -889 (C \rightarrow T) was also

described (McDowell et al. 1995). The occurrence of specific alleles of these reported IL-1 gene polymorphisms has been associated with an increased cytokine production (Pociot et al. 1992; Danis et al. 1995; Santilla et al. 1998; Shirodaria et al. 2000) and related to a variety of infectious and immuno-inflammatory diseases (Karjalainen et al. 2002; Machado et al. 2001; Read et al. 2000; Takamatsu et al. 2000; Nemetz et al. 1999; Heresbach et al. 1997).

The relationship between polymorphisms in the IL-1 genes and periodontal disease has been extensively studied. A composite genotype, comprising allele T at IL-1A (-889) and at IL-1B (+3953) *loci*, was described as a genetic marker for increased risk to severe periodontitis on non-smokers (Kornman et al. 1997). It was shown that patients with these alleles produce increased levels of IL-1 (Engebretson et al. 1999) and are more susceptible to develop severe periodontal disease (Kornman et al. 1997; Mc Devitt et al. 2000; Parkhill et al. 2000; Papapanou et al. 2001). However, the use of IL-1 genotype as a genetic susceptibility test has been questioned (Greenstein & Hart 2002), since several studies have shown that IL-1 genotype prevalence varies in different ethnic groups (Diehl et al. 1999; Walker et al. 2000; Armitage et al. 2000; Caffesse et al. 2002),

In the early implant loss, the surgical trauma, in consequence of implant insertion, initiates a local inflammatory response that includes the release and activation of a variety of cytokines and growth factors. This local factor production determines the quality of bone formation or the formation of fibrosis (Schwartz et al. 1999). Increased levels of bone resorptive interleukins, such as IL-1, might stimulate an excessive inflammatory response, affecting osseointegration success. Therefore, it seems reasonable to evaluate if the individual's ability to produce higher or lower quantities of IL-1 could influence the implant failure mechanism.

The aim of this study was to investigate the possible association between early failure of dental implants and four polymorphisms previously described: IL-1B (-511), IL-1B (+3953), IL-1A (-889) and IL-1 RN (intron 2).

Material and methods

Subject selection

The subject population of this retrospective study was obtained from the pool of patients treated in the Bucco-Maxillofacial Surgery Service of the Dental School of Piracicaba, State University of Campinas (Piracicaba, SP, Brazil) and in the private clinic of a periodontist (Bezerra, FJB) that has been working with dental implants for 13 years.

Out of 2993 implants inserted between 1993 and 2002, 121 had been lost due to several causes (failure rate 4%). For this study, we have selected:

- 1) Control group: 34 patients with one or more healthy implants. These patients had at least one implant that had been in function for a minimal period of 1 year.
- 2) Test group: 28 patients that had suffered one or more early implant failures. The implants were considered early lost when presented mobility and/or pain before or during the abutment connection and needed to be removed.

Both control and test groups were composed by white subjects in good general health that had been treated with implant systems that follow Brånemark protocol of two surgical stages: *3i Implant Innovations, Inc* (West Palm Beach, FL, USA) and *Conexão Implant System and Prosthesis* (São Paulo, SP, Brazil). The exclusion criteria for these patients were smoke habits, history of chronic illness, such as cardiovascular, diabetes, osteoporosis, immune or bleeding disorders and radiotherapy or chemotherapy previous exposure. Patients who had loaded implants during the osseointegration period, history of any postoperative complication, such as infection, and use of any regenerative procedure previous or concomitant to implant surgery, such as grafts or regenerative membranes, were also excluded. The baseline clinical parameters for the subject population are presented in table 1 and the characteristics of implant failure in each patient of the test group are presented in table 2.

This study was carried out with the approval of the FOP/UNICAMP Ethics Committee (protocol 006/02) and informed consent was obtained from all subjects.

Analysis of genetic polymorphisms

From all subjects, epithelial buccal cells were sampled according to the procedures described by Trevilatto & Line (2000). DNA was extracted from cell samples using a

standard phenol/chloroform protocol (Maniattis et al. 1989) and blindly analyzed for polymorphisms in the IL-RN gene intron-2 (Tarlow et al. 1993), in the IL-1B gene at positions -511 (Di Giovine et al. 1992) and +3953 (Pociot et al. 1992), and in the IL-1A gene at position -889 (Mc Dowell et al. 1995).

The amplification reactions (PCR) were carried out in a *Perkin-Elmer GeneAmp 2400* thermal cycler and were performed with 300 to 700 ng DNA in a volume of 50 μ L in reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, deoxyribonucleotides (200 μ M each) and 2 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The primers and MgCl₂ concentrations varied in each type of reaction and are detailed below.

Polymorphism in the IL-1RN gene intron-2 (VNTR)

Primers: 5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' and 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3' (both 1 μ M), MgCl₂ (1.5 mM). Cycling was 1 min at 96°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 2 min at 70°C, and an additional 3 min at 70°C and 55°C for 3 min. In the second intron of IL-1RN gene, five alleles were defined by different numbers of a 86 bp segment repeat. Genotypes were determined by comparing the size of the bands with a molecular weight ladder, with separation into allele 1 (4 repeats - 412 bp), allele 2 (2 repeats - 240 bp), allele 3 (3 repeats - 326 bp), allele 4 (5 repeats - 498 bp) and allele 5 (6 repeats - 584 bp).

Polymorphism in the IL-1B gene at position -511

Primers: 5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' and 5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT - 3'. (both 1 μ M), MgCl₂ (4 mM). The reaction mixture was submitted to 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 56°C and 1 min at 72°C, and a final extension of 72°C for 4 min. The products were digested with 3 U per 25 μ L reaction of *Ava*I at 37°C overnight (ON) to detect allele C (114 bp + 190 bp) and allele T (304 bp).

Polymorphism in the IL-1B gene at position +3953 (5th exon)

Primers: 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3' and 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG 3' (both 1 μ M), MgCl₂ (2.5 mM). Cycling was 4 min at

95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 67.5°C and 1 min at 72°C, and a final extension of 72°C for 4 min. The products were digested with 3 U per 25 µL reaction of *Taq* I at 65°C ON to yield allele C (85 bp + 97 bp + 12 bp) and allele T (182 bp + 12 bp).

Polymorphism in the IL-1A gene at position -889

Primers: 5'-AAGCTTGTCTACCACCTGAACTAGGC-3' and 5'-TTACATATGAGCCTTCCATG-3' (both at 1 µM), MgCl₂ (2.5 mM). The reaction was incubated for 3 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C and a final extension of 72°C for 5 min. The products were digested with 3 U per 25 µL reaction of *Nco*I at 37°C ON to detect allele C (16 bp + 83 bp) and allele T (99 bp).

Restriction products were visualized by electrophoresis on vertical 10 % polyacrylamide gels in 1X TBE (89 mM Tris-Borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), followed by rapid silver staining method (Sanguinetti et al. 1994).

Since IL-1A, IL-1B and IL-1RN genes are found in tight cluster on chromosome 2, it is believed they could be inherited as a unit. So, in this study the polymorphisms were analyzed not only isolated, but also in combinations, nominated haplotypes.

Data Analysis

The allele and genotype frequencies between patients with early failed implants and control subjects were assessed by chi-square test using the BioEstat program (v 1.0 – Ayres 1998) or by Monte Carlo simulations using the CLUMP program (Sham & Curtis 1995). A *p*-value <0.05 was considered significant. The ARLEQUIN software package (v 2.0 – Schneider et al. 2000) was used in order to calculate Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium, and to determine the putative haplotypes. The CLUMP program was also used to assess differences between control and test groups regarding the haplotype frequencies. This program is designed for use in genetic case-control studies, in which multiple alleles are being considered and the observed frequencies of some alleles are rare.

Results

Table 3 shows the allele and genotype frequencies of the four IL-1 gene polymorphisms studied in the control and test groups. There was no significant difference in the genotype distribution between patients with successful and failure implants in the polymorphisms IL-1RN ($p=0.783$), IL-1B⁻⁵¹¹ ($p=0.195$), IL-1B⁺³⁹⁵³ ($p=0.855$) and IL-1A⁻⁸⁸⁹ ($p=1.0$), neither was observed statistical variation in the frequency of the alleles in any of the polymorphisms studied: IL-1RN ($p=0.662$), IL-1B⁻⁵¹¹ ($p=0.574$), IL-1B⁺³⁹⁵³ ($p=0.893$) and IL-1A⁻⁸⁸⁹ ($p=0.894$).

In the control group, for all studied polymorphisms, the genotype distribution was conformed to expectations based on Hardy-Weinberg analysis. Regarding the failure group, in contrast to the other polymorphic *loci*, IL-1B⁻⁵¹¹ *locus* failed to fit to Hardy-Weinberg equilibrium probably due to an excess of heterozygotes (observed frequency 25% and expected frequency 49%, $p=0.015$).

The distribution of haplotypes between the two studied groups is shown in table 4 and no statistically significant difference was observed ($p=0.8611$).

Pairwise linkage disequilibrium was tested for all polymorphisms studied and significant evidence of disequilibrium was observed only between IL-1A⁻⁸⁸⁹ and IL-1B⁺³⁹⁵³ polymorphic sites ($p=0.00014$ for the control group and $p=0.0238$ for the test group).

Discussion

Cytokines have a physiologic role in bone metabolism. However, high levels of them may lead to increased bone loss, resulting in a less favorable outcome or implant failure. In this regard, increased levels of IL-1 β were found in gingival crevicular fluid from diseased implants when compared to healthy sites (Kao et al. 1995; Panagakos et al. 1996; Salcetti et al. 1997). Individuals may demonstrate consistent differences in cytokine secretion, which are probably genetically predetermined (Cork et al. 1996). We tested if the alleles related to the ability to produce higher quantities of IL-1 could influence the early implant failure mechanism in non-smokers.

A few studies have analyzed the relationship between polymorphisms in the IL-1 gene and implant failure. Wilson & Nunn (1999) were the first to study the relationship

between implant loss and the IL-1 composite genotype reported by Kornman *et al.* (1997) [allele T at IL-1A (-889) and at IL-1B (+3953) *loci*]. Their analysis failed to provide a positive correlation, but these results might have been influenced by variables, such as the presence of smokers and the existence of late and early failure implants in the same sample. Rogers *et al.* (2002) also found no association between the IL-1 composite genotype and failure of dental implants.

In the present study, we did not observe correlation between this IL-1 composite genotype and the early implant failure in non-smoking patients (table 5). Recently, it has been demonstrated that the IL-1 composite genotype alone does not appear to influence the risk for peri-implant bone loss, but the risk was significantly higher when associated with smoking (Feloutzis *et al.* 2003). In our study the smokers were excluded, since it was demonstrated that smoking is such a strong risk factor (almost 2.5) for implant failure that could overcome the effect of IL-1 genotype (Wilson & Nunn 1999). The frequency of the IL-1 composite genotype in our sample group (62 individuals) was 29% (18 individuals). This result was closer to that reported by Kornman *et al.* (1997) for Caucasian Europeans (29.1%) and by Caffesse *et al.* (2002) for Hispanics (28%) than to African-Americans healthy and with localized juvenile periodontitis, 14.5% and 8% respectively (Walker *et al.* 2000). We also observed that the IL-1A (-889) and IL-1B (+3953) polymorphic sites were in linkage disequilibrium both in the test and the control groups (respectively $p=0.0238$ and $p=0.00014$), confirming data showed by Gore *et al.* (1998) in a Caucasian population. In addition, Diehl *et al.* (1999) showed that these polymorphisms were in strong disequilibrium in Caucasians, but not in African-Americans. In our sample, blacks and mulattos were excluded, so the observed data may reflect the strong European heritage in the Brazilian population (IBGE 2000).

Our study was the first to analyze the relationship between implant failure and the polymorphisms in the IL-1B (-511) and IL-1RN genes. Allele T of the IL-1B (-511) has been associated with certain infectious and immuno-inflammatory diseases (Karjalainen *et al.* 2002; Read *et al.* 2000; Nemetz *et al.* 1999; Machado *et al.* 2001) as well as increased plasma levels of IL-1 β and IL-1ra proteins (Hurme & Santilla 1998). The IL-1ra protein is an important endogenous regulator of inflammation, since it acts as a competitive inhibitor of

IL-1 α and IL-1 β (Dinarello 1996). The allele 2 of the IL-1 RN gene polymorphism was associated with increased production of IL-1ra protein (Danis et al. 1995) and with several inflammatory diseases (Mansfield et al. 1994; Buchs et al. 2001; Boiardi et al. 2000). In the present study both IL-1B (-511) and IL-1RN polymorphisms failed to show a relationship with the early implant failure.

The influence of polymorphisms on expression of proteins is not as simple as might be expected, several polymorphic sites may act in synergy by complex interactions. Thus the analysis of polymorphisms in haplotypes is more appropriate in genetic studies. The present study was the first to analyze the association of IL-1 gene cluster haplotypes with implant failure. The results showed no difference in the first common haplotype carriage (IL-1RA 1 + IL-1B⁻⁵¹¹ C + IL-B⁺³⁹⁵³ C + IL-A⁻⁸⁸⁹ C) and the second one (IL-1RA 1 + IL-1B⁻⁵¹¹ T + IL-B⁺³⁹⁵³ C + IL-A⁻⁸⁸⁹ C) between control and test groups ($p=0.8611$).

The lack of association in our results could be a consequence of our limited sample size. However, the very high p -values found in our analysis are indicative that there is indeed a lack of correlation. In fact, early implant failure is not a frequent event and when smokers are ruled out the study population is substantially reduced. Other possible explanation is that if really exists any genetic influence on implant failures, it could operate through a combination of polymorphisms in different pro-inflammatory cytokine or growth factor genes. It is also possible that the critical step of early failures is not at the level of cytokine production but at a later stage of bone formation, such as calcification of bone organic matrix.

The role of cytokines in periodontal disease is well documented in the literature (Gemmell et al. 1997; Genco 1992), but there is much to be learnt about their role on implant osseointegration. It has been shown that dental implants are not physiologically inert and can activate the complement system (Perala et al. 1991). This activation would cause the secretion of IL-1 by monocytes and macrophages (Perala et al. 1991). Perala *et al.* (1992) showed that human peripheral blood mononuclear cells were stimulated by different types of dental implants to secrete increased levels of IL-1 β and TNF- α . Macrophages exposed to titanium particles released high levels of TNF- α , resulting in the inhibition of bone formation (Tsutsui et al. 1999).

It was concluded that polymorphisms in the IL-1RN (intron 2), IL-1B (-511), IL-1B (+3953) and IL-1A (-889) genes were not associated with early implant failure in a non-smoking Brazilian population. Despite of the negative results presented in this and other studies, new researches should be conducted using different populations. Furthermore, polymorphisms at other inflammatory mediator genes should be evaluated in an attempt to clarify the real role of genetic factors in the implant failure. We believe that the finding of several genetic markers related with early implant failure could be of clinical value to a precise and early identification of individuals at high risk to implant loss. It will lead to a more strict selection of patients and, in future, individual therapies would be developed, increasing the implants success rates.

Acknowledgment

This work was supported by CNPq grant 131363/2002-6.

References

- Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990;5(4):347-59.
- Albrektsson T. A multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent*. 1988;60(1):75-84.
- Cox JF, Zarb GA. The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1987;2(2):91-100.
- Armitage, G.C., Wu, Y., Wang, H.Y., Sorrell, J., Di Giovine, F.S. & Duff, G.W. (2000) Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *Journal of Periodontology* **71**: 164–171.
- Ayres, M. (1998) *BioEstat: statistical applications in the area of medical and biological sciences (BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas)*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, Manaus, Brasil.

- Boiardi, L., Salvarani, C., Timms, J.M., Silvestri, T., Macchioni, P.L. & Di Giovine, F.S. (2000) Interleukin-1 cluster and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica. *Clinical and Experimental Rheumatology* **18**: 675-681.
- Buchs, N., Di Giovine, F.S., Silvestri, T., Vannier, E., Duff, G.W. & Miossec, P. (2001) IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes and Immunity* **2**: 222-228.
- Caffesse, R.G., De La Rosa, R.M. & De La Rosa, G.M. (2002) Interleukin-1 gene polymorphism in a well-maintained periodontal patient population. *Brazilian Journal of Oral Sciences* **1**: 1-6.
- Cork, M.J., Crane, A.M. & Duff, G.W. (1996) Genetic control of cytokines. Cytokine gene polymorphisms in alopecia areata. *Dermatologic Clinics* **14**: 671-678.
- Danis, V.A., Millington, M., Hyland, V.J. & Grennan, D. (1995) Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor-antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clinical & Experimental Immunology* **99**: 303-310.
- Deas, D.E., Mikotowicz, J.J., Mackey, S.A. & Moritz, A.J. (2002) Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. *Implant Dentistry* **11**: 235-242.
- Di Giovine, F.S., Takhsh, E., Blackmore, A.L. & Duff, G.W. (1992) Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 β gene (IL-1 β). *Human Molecular Genetics* **1**: 450.
- Diehl, S.R., Wang, Y., Brooks, C.N., Burmeister, J.A., Califano, J.V., Wang, S. & Schenkein, H.A. (1999) Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **70**: 418-430.
- Dinarello, C.A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**: 1627-1652.
- Dinarello, C.A. (1996) Biologic basis for Interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-2147.
- Engebretson, S.P., Lamster, I.B., Herrera-Abreu, M., Celenti, R.S., Timms, J.M., Chaudhary, A.G., Di Giovine, F.S. & Kornman, K.S. (1999) The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *Journal of Periodontology* **70**: 567-573.

- Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998a) Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Science* **106**: 527–551.
- Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen, P. (1998b) Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *European Journal of Oral Sciences* **106**: 721–764.
- Feloutzis, A., Lang, N.P., Tonetti, M.S., Burgin, W., Bragger, U., Buser, D., Duff, G.W. & Kornman, K.S. (2003) IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 10-17.
- Gemmell, E., Marshall, R.I. & Seymour, G.J. (1997) Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000* **14**: 112–143.
- Genco, R.J. (1992) Host responses in periodontal diseases: current concepts. *Journal of Periodontology* **63**: 338-355.
- Gore, E.A., Sanders, J.J., Pandey, J.P., Palesch, Y. & Galbraith, G.M. (1998) Interleukin-1beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **25**: 781–785.
- Greenstein, G. & Hart, T.C. (2002) A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **73**: 231-247.
- Heresbach, D., Alizadeh, M., Dabadie, A., Le Berre, N., Colombel, J.F., Yaouanq, J., Bretagne, J.F. & Semana, G. (1997) Significance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist genetic polymorphism in inflammatory bowel diseases. *American Journal of Gastroenterology* **92**: 1164-1169.
- Hurme, M. & Santtila, S. (1998) IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *European Journal of Immunology* **28**: 2598-2602.
- Hutton, J.E., Heath, M.R., Chai, J.Y., Harnett, J., Jemt, T., Johns, R.B., McKenna, S., McNamara, D.C., van Steen-berghe, D. & Taylor, R. (1995) Factors related to success and

- failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **10**: 33–42.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Brasil: 500 anos de povoamento. IBGE, Rio de Janeiro, 2000.
- Kao, R.T., Curtis, D.A., Richards, D.W. & Preble, J. (1995) Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **10**: 696–701.
- Karjalainen, J., Nieminen, M.M., Aromaa, A., Klaukka, T. & Hurme, M. (2002) The IL-1beta genotype carries asthma susceptibility only in men. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109**: 514-516.
- Kornman, K.S., Crane, A., Wang, H.Y., Di Giovine, F.S., Newman, M.G., Pirk, F.W., Wilson, T.G., Higginbottom, F.L., Jr & Duff, G.W. (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **24**: 72–77.
- Lekholm, U.G.J., Henry, P., Higuchi, K., Linden, U., Bergstrom C. & van Steenberghe, D. (1999) Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **14**: 636–645.
- Lennard, A.C. (1995) Interleukin-1 receptor antagonist. *Critical Reviews in Immunology* **15**: 77-105.
- Listgarten, M.A., Lang, N.P., Schroeder, H.E. & Schroeder, A. (1991) Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research* **2**: 1-19.
- Machado, J.C., Pharoah, P., Sousa, S., Carvalho, R., Oliveira, C., Figueiredo, C., Amorim, A., Seruca, R., Caldas, C., Carneiro, F. & Sobrinho-Simoes, M. (2001) Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* **121**: 823-829.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1989) In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mansfield, J.C., Holden, H., Tarlow, J.K., Di Giovine, F.S., McDowell, T.L., Wilson, A.G., Holdsworth, C.D. & Duff, G.W. (1994) Novel genetic association between ulcerative colitis

and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* **106**: 637-642.

McDevitt, M.J., Wang, H.Y., Knobelman, C., Newman, M.G., Di Giovine, F.S., Timms, J., Duff, G.W. & Kornman, K.S. (2000) Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *Journal of Periodontology* **71**: 156-163.

McDowell, T.L., Symons, J.A., Ploski, R., Fárre, O. & Duff, G.W. (1995) A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis and Rheumatism* **38**: 221-222.

Nemetz, A., Nosti-Escanilla, M.P., Molnar, T., Kope, A., Kovacs, A., Feher, J., Tulassay, Z., Nagy, F., Garcia-Gonzalez, M.A. & Pena, A.S. (1999) IL-1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* **49**: 527-531.

Nguyen, L., Dewhirst, F.E., Hauschka, P.V. & Stashenko, P. (1991) Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine and Cytokine Research* **10**: 15-21.

Nicklin, M.J., Weith, A. & Duff, G.W. (1994) A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* **19**: 382-384.

Panagakos, F.S., Aboyousssef, H., Dondero, R. & Jandinski, J.J. (1996) Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **11**: 794-799.

Papapanou, P.N., Neiderud, A.M., Sandros, J. & Dahlen, G. (2001) Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *Journal of Clinical Periodontology* **28**: 389-396.

Parfitt, A.M. (1994) The two faces of growth: benefits and risks to bone integrity. *Osteoporosis International* **4**: 382-398.

Parkhill, J.M., Hennig, B.J., Chapple, I.L., Heasman, P.A. & Taylor, J.J. (2000) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **27**: 682-689.

Perala, D.G., Chapman, R.J. & Gelfand, J.A. (1991) Complement activation by dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **6**: 136-141.

- Perala, D.G., Chapman, R.J., Gelfand, J.A., Callahan, M.V., Adams, D.F. & Lie, T. (1992) Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *Journal of Periodontology* **63**: 426-430.
- Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H. & Nerup, J. (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion *in vitro*. *European Journal of Clinical Investigations* **22**: 396-402.
- Read, R.C., Camp, N.J., Di Giovine, F.S., Borrow, R., Kaczmarek, E.B., Chaudhary, A.G. Fox, A.J. & Duff, G.W. (2000) An interleukin-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease. *The Journal of Infectious Diseases* **182**: 1557-1560.
- Rogers, M.A., Figliomeni, L., Baluchova, K., Tan, A.E., Davies, G., Henry, P.J. & Price, P. (2002) Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *Journal of Periodontology* **37**: 37-41.
- Salcetti, J.M., Moriarty, J.D., Cooper, L.F., Smith, F.W., Collins, J.G., Socransky, S.S. & Offenbacher, S. (1997) The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **12**: 32-42.
- Sanguinetti, C.J., Dias, E.N. & Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17**: 915-919.
- Santilla, S., Savinainen, K. & Hurme, M. (1998) Presence of the IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. *Scandinavian Journal of Immunology* **47**: 195-198.
- Santos, M.C.L.G., Campos, M.I.G. & Line, S.R.P. (2002) Early dental implant failure: a review of literature. *Brazilian Journal of Oral Sciences* **1**: 103-111.
- Schneider, S. Roessli, D. & Excoffier, L. (2000) ARLEQUIM ver. 2000: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schwartz, Z., Lohmann, C.H., Cochran, D.L., Sylvia, V.L., Dean, D.D. & Boyan B.D. (1999) Bone regulating mechanisms on implant surfaces. In: Lang, N.P., Karring, T. & Lindhe, J., eds. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology: Implant Dentistry*, 1st ed, 41-54. Chicago: Quintessence Publishing.

- Sham, P.C. & Curtis, D. (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals of Human Genetics* **59**: 97-105.
- Shirodaria, S., Smith, J., McKay, I. J., Kennet, C. N., & Hugh, F. J. (2000) Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1 alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *Journal of Dental Research* **79**: 1864-1869.
- Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. & Ago, J.M. (1987) Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of Immunology* **138**: 1464–1468.
- Takamatsu, M., Yamauchi, M., Maezawa, Y., Saito, S., Maeyama, S. & Uchikoshi, T. (2000) Genetic polymorphisms of interleukin-1 beta in association with the development of alcoholic liver disease in Japanese patients. *American Journal of Gastroenterology* **95**: 1305-1311.
- Tarlow, J.K., Blakemore, A.I.F., Lennard, A., Solari, R., Steinkasserer, A. & Duff, G.W. (1993) Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Human Genetics* **91**: 403-404.
- Tatakis, D.N. (1993) Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *Journal of Periodontology* **64**: 416-431.
- Trevilatto, P.C. & Line, S.R.P. (2000) Use of Buccal Epithelial Cells for PCR Amplification of Large DNA Fragments. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* **18**: 6-9.
- Tsutsui, T., Kawaguchi, H., Fujino, A., Sakai, A., Kaji, H. & Nakamura, T. (1999) Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *Journal of Orthopedic Science* **4**: 32-38.
- Walker, S.J., Van Dyke, T.E., Rich, S., Kornman, K.S., Di Giovine, F.S. & Hart, T.C. (2000) Genetic polymorphisms of the IL-1alpha and IL-1beta genes in African-American LJP patients and an African-American control population. *Journal of Periodontology* **71**: 723–728.
- Weyant, R.J. & Burt, B.A. (1993) An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *Journal of Dentistry Research* **72**: 2–8.

Wilson, T.G. Jr & Nunn, M. (1999) The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *Journal of Periodontology* **70**: 724–729.

Table 1. Baseline clinical parameters of the subject population (n=62).

Parameters	Control group (n=34)	Test group (n=28)
Mean age	43.3	52.7
Gender (n)		
Female	16	15
Male	18	13

Table 2. Number of inserted implants, number of failed implants, time of failure after surgery, clinical sign of failure and time of failure in relation to abutment connection in each patient of test group.

Patients of test group	Number of inserted implants	Number of failed implants	Time of failure after surgery	Clinical sign of failure	Time of failure concerning abutment connection
T1	02	01	4 months	Mobility	Before connection
T2	08	01	6 months	Mobility	Before connection
T3	02	01	8 months	Mobility	During connection
T4	07	03	6 months	Mobility/ pain	Before connection
T5	01	01	1 year	Mobility	During connection
T6	01	01	7 months	Mobility	During connection
T7	02	01	11 months	Pain	During connection
T8	08	02	6 months	Mobility	Before connection
T9	03	02	4 months	Mobility	Before connection
T10	01	01	8 months	Mobility/ pain	During connection
T11	01	01	1 year	Mobility	During connection
T12	06	03	2 months	Mobility	Before connection
T13	06	01	5 months	Mobility	During connection
T14	01	01	3 months	Mobility/ pain	Before connection
T15	04	01	3 months	Mobility	Before connection
T16	01	01	4 months	Mobility	Before connection
T17	02	02	2 months	Mobility	Before connection
T18	01	01	3 months	Mobility	Before connection
T19	06	01	4 months	Mobility	Before connection
T20	09	01	3 months	Mobility	Before connection
T21	07	05	5 months	Mobility/ pain	During connection
T22	01	01	6 months	Mobility	Before connection
T23	03	02	6 months	Mobility	During connection
T24	01	01	2 months	Mobility	Before connection
T25	08	03	3 months	Mobility	Before connection
T26	02	01	4 months	Mobility	Before connection
T27	02	01	3 months	Mobility	Before connection
T28	03	01	4 months	Mobility	Before connection

Table 3. IL-1RN, IL-1B⁻⁵¹¹, IL-1B⁺³⁹⁵³ and IL-1A⁻⁸⁸⁹ allele and genotype distribution in patients with successful (control group) and failed implants (test group).

	Control group n=34 (%)	Test group n=28(%)	χ^2	p value
<i>IL-1RN alleles</i>				
Allele 1	38 (55.8)	36 (64.2)	$\chi^2=0.9838$	0.6623 [#]
Allele 2	29 (42.6)	19 (33.9)		
Allele 4	1 (1.4)	1 (1.7)		
<i>IL-1RN genotypes</i>				
A1/A1	18 (52.9)	11 (39.2)	$\chi^2=1.1500$	0.7832 [#]
A1/A2	13 (38.2)	13 (46.4)		
A2/A2	2 (5.8)	3 (10.7)		
Rare genotypes	1 (2.9)	1 (3.5)		
<i>IL-1B -511 alleles</i>				
Allele C	38 (55.8)	35 (62.5)	$\chi^2=0.555$	0.5742
Allele T	30 (44.1)	21 (37.5)		
<i>IL-1B -511 genotypes</i>				
C/C	11 (32.3)	14 (50)	$\chi^2=3.2018$	0.1958 [#]
C/T	16 (47.0)	7 (25)		
T/T	7 (20.5)	7 (25)		
<i>IL-1B +3953 alleles</i>				
Allele C	54 (79.4)	43 (76.7)	$\chi^2=0.124$	0.8934
Allele T	14 (20.5)	13 (23.2)		
<i>IL-1B +3953 genotypes</i>				
C/C	22 (64.7)	18 (64.2)	$\chi^2=0.4835$	0.8551 [#]
C/T	10 (29.4)	07 (25)		
T/T	2 (5.8)	3 (10.7)		
<i>IL-1A -889 alleles</i>				
Allele C	47 (69.1)	39 (69.6)	$\chi^2=0.004$	0.8945
Allele T	21 (30.8)	17 (30.3)		
<i>IL-1A -889 genotypes</i>				
C/C	18 (52.9)	15 (53.5)	$\chi^2=0.0024$	1.00 [#]
C/T	11 (32.3)	9 (32.1)		
T/T	5 (14.7)	4 (14.2)		

p values marked with (#) were calculated using the CLUMP program and p values not marked were calculated using the BioEstat program.

Table 4. Distribution of IL-1RN/IL-1B⁻⁵¹¹/IL-1B⁺³⁹⁵³/IL-1A⁻⁸⁸⁹ haplotypes in patients with successful (control group) and failed implants (test group).

Haplotypes (IL-1RN/ B-511/ B+3953/ A-889)	Control group n=34 (%)	Test group n=28 (%)
1CCC	21 (30.8)	15 (26.7)
1CCT	3 (4.4)	4 (7.1)
1CTC	1 (1.4)	3 (5.3)
1CTT	7 (10.2)	4 (7.1)
1TCC	13 (19.1)	7 (12.5)
1TCT	2 (2.9)	2 (3.5)
1TTT	2 (2.9)	1 (1.7)
2CCC	5 (7.3)	6 (10.7)
2CCT	1 (1.4)	1 (1.7)
2TCC	6 (8.8)	7 (12.5)
2TTC	1 (1.4)	0 (0)
2TTT	2 (2.9)	3 (5.3)
2TCT	3 (4.4)	1 (1.7)
2CTC	0 (0)	1 (1.7)
4CTT	0 (0)	1 (1.7)
4TTT	1 (1.4)	0 (0)
$p=0.8611$		
$\chi^2=5.4865$		

p value was calculated using the CLUMP program.

Table 5. Distribution of the IL-1 composite genotype [allele T (IL-1A-889) + allele T (IL-1B+3953)] in patients with successful (control group) and failed implants (test group).

	Control group n=34 (%)	Test group n=28 (%)
Composite genotype	10 (29.4)	8 (28.5)
Other genotypes	24 (70.5)	20 (71.4)
$p=0.8348$		
$\chi^2=0.005$		

p value was calculated using the BiosEstat program.

ANEXO 3

Artigo aceito para publicação na revista *Implant Dentistry*.

EARLY FAILURE OF DENTAL IMPLANTS AND TNF- α (G-308A) GENE POLYMORPHISM

Campos M.I.G., Santos M.C.L.G., Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Bezerra, F.J.B.,
Line S.R.P.

Maria Isabela Guimarães Campos

MS, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

MS, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Paula Cristina Trevilatto

PHD, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC-PR), Curitiba,
PR, Brazil.

Raquel Mantuaneli Scarel-Caminaga

PHD, University of the Sacred Heart, Bauru, SP, Brazil.

Fábio José Barbosa Bezerra

Private Practice in Periodontics, Salvador, BA, Brazil.

Sergio Roberto Peres Line

PHD, Department of Morphology, Dental School of Piracicaba, State University of
Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Author for correspondence and reprint requests:

Sergio Roberto Peres Line

Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP

Departamento de Morfologia

Av. Limeira, 901, CP 52, CEP 13.414-903, Piracicaba-SP, Brasil,

Phone: +55-019-34125333

Fax: +55-019-34125218

e-mail: serglin@fop.unicamp.br

Abstract

Background: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a potent inflammatory mediator with bone resorption activity. Polymorphisms in the promoter region of the human TNF- α gene have been shown to affect the levels of this cytokine and have been associated with a variety of diseases. The aim of this study was to investigate the possible relationship between early implant failure and a single nucleotide polymorphism (SNP) in the -308 promoter region of the TNF- α gene.

Methods: A sample of 66 non-smokers was divided into two groups: test group comprising 28 patients (mean age 52.7) with one or more early failed implants and control group consisting of 38 individuals (mean age 43.2) with one or more healthy implants. Genomic DNA from buccal mucosa was amplified by the polymerase chain reaction (PCR), analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and submitted to polyacrylamide gel electrophoresis to distinguish allele G and allele A of the TNF- α (-308) gene polymorphism. Differences in the allele and genotype frequencies between control and test groups were assessed by Chi-square test ($p < 0.05$).

Results: It was not observed significant difference in the allele ($p = 0.4635$) and genotype ($p = 0.4445$) distribution of the polymorphism when control and failure groups were compared.

Conclusion: The results indicate that the TNF- α (G-308A) gene polymorphism is not associated with early implant failure, suggesting that its presence alone does not constitute a genetic risk factor for implant loss in the Brazilian population.

Key words: TNF-alpha, polymorphism, implant failure, osseointegration, dental implants.

INTRODUCTION

Despite of the high success rates showed by osseointegrated implants^{1,2}, failures still occur. Regarding the timing of failure, it can be classified as early when osseointegration fails to occur, or late when the achieved osseointegration is lost after loading^{3,4}. Bone is a dynamic tissue continuously remodeled through resorption and formation⁵, controlled by local production of cytokines, one of them is the TNF- α ⁶.

Tumor necrosis factor- α is a potent mediator of immune-inflammatory response, mainly produced by macrophages^{7,8}. This factor seems to have similar biologic effects as interleukin-1 (IL-1)⁹. It has been shown to induce the secretion of collagenase¹⁰, prostaglandin E₂¹¹ and interleukins, such as IL-6 and IL-8¹². TNF- α has also been reported to induce bone resorption *in vitro* and *in vivo*^{13,14,15}. In addition, elevated levels of this cytokine have been associated with several diseases¹⁶⁻¹⁸, including periodontitis¹⁹⁻²¹.

One of the single nucleotide polymorphisms identified in the promoter region of the human TNF- α gene is a guanine (G) to adenosine (A) transition at position -308²², that generates the alleles G and A. The allele A has been found to be a strong transcription activator²³⁻²⁵, resulting in higher TNF- α levels. Furthermore, this allele has also been linked to several diseases such as Alzheimer disease²⁶, rheumatoid arthritis²⁷, systemic lupus erythematosus²⁸, asthma²⁹ and type 2 diabetes³⁰.

High levels of inflammatory mediators have been found in diseased implant sites when compared to healthy ones³¹⁻³³. It suggests that despite of the physiologic role of cytokines in bone metabolism, high levels of them may lead to increased bone loss, resulting in a less favorable outcome or implant failure.

Regarding the early loss, the surgical trauma, in consequence of implant insertion, initiates a local inflammatory response that includes the release and activation of a variety of cytokines and growth factors. This local factor production determines the quality of bone formation or the formation of fibrosis³⁴. Perhaps, increased levels of bone resorptive cytokines, such as TNF- α , might stimulate an excessive inflammatory response, affecting osseointegration success.

Individuals may demonstrate consistent differences in cytokine secretion³⁵, which are probably genetically predetermined³⁶. We hypothesized that the ability to produce higher or lower quantities of TNF- α could influence the implant failure mechanism. In order to test this hypothesis, the aim of the present study was to investigate the possible association between early failure of dental implants and the TNF- α (G-308A) gene polymorphism.

MATERIAL AND METHODS

Subject selection

Sixty-six white subjects in good general health were screened from private practices of periodontics and from the patient pool of the Surgery Service of the Dentistry School of Piracicaba (FOP/UNICAMP). The patients were from the Southeastern and Northeast regions of Brazil. This study was carried out with the approval of the FOP/UNICAMP Ethics Committee (protocol 006/02) and informed consent was obtained from all subjects.

All patients had been treated with implant systems that followed Brånemark protocol of two surgical stages: 3i Implant Innovations, Inc (West Palm Beach, FL, USA) and Conexão Implant System and Prosthesis (São Paulo, SP, Brazil).

The baseline clinical parameters for the subject population are presented in Table 1. Subjects were divided into two groups:

- 1) Control group: 38 individuals with one or more healthy implants. These patients had at least one implant that had been in function for a minimal period of one year.
- 2) Test group: 28 individuals who had one or more early failed implants. The implants were considered early lost when presented mobility and/or pain before or during the abutment connection and needed to be removed.

The subjects did not have any of the following exclusion criteria: smoke habits, history of chronic illness, such as cardiovascular diseases, diabetes, osteoporosis, immune or bleeding disorders and radiotherapy or chemotherapy previous exposure. There were also excluded patients who had loaded implants during the osseointegration period, history of any postoperative complication, such as infection, and use of any regenerative procedure previous or concomitant to implant surgery.

DNA extraction

From all subjects, epithelial buccal cells were sampled as the method described by Trevilatto & Line³⁷ (2000). DNA was purified from cell samples by sequential phenol/chloroform extraction and salt/ethanol precipitation³⁸. DNA concentration was estimated by measurements of OD 260/280.

Polymorphism in the TNF- α gene at position -308

PCR was used to amplify a 107-basepair (bp) fragment of the TNF- α genomic sequence using the following primers: 5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3' and 3' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG 5'. Amplification reactions were carried out in a *Perkin-Elmer GeneAmp 2400* thermal cycler and were performed with 300 to 700 ng of DNA in a total volume of 50 μ L mixture, containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 μ M of each primer, 200 μ M of each deoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) and 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The following PCR protocol was used: 2 cycles of 94°C for 3 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension of 72°C for 7 min. The PCR product was digested with 2 U *NcoI* restriction enzyme at 37°C overnight to detect allele G (87 pb + 20 pb) and allele A (107 pb).

Restriction products were visualized by electrophoresis on vertical 10 % polyacrylamide gels in 1X TBE (89 mM Tris-Borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA), followed by rapid silver staining method³⁹.

Data Analysis

The allele ratio and genotype distribution between patients with early failed implants and control subjects were analyzed by Chi-square test. A *p* value <0.05 was considered significant.

RESULTS

The genotype distribution of TNF-polymorphism was consistent with the expectations of Hardy-Weinberg equilibrium in both groups.

There were no significant differences in the genotype distribution ($p=0.4445$) and allele frequencies ($p=0.4635$) when control subjects and patients with early failed implants were compared. These data are shown in table 2.

Considering the whole population, allele A was carried by 12.1% (8/66) of the subjects with no presence of homozygotes.

DISCUSSION

Infection, overheating, premature loading and impaired healing are main factors associated with early failure of dental implants⁴⁰⁻⁴². However, in some situations, only clinical factors do not explain why some patients develop this kind of loss⁴³.

The knowledge that implant failure tends to cluster in subsets of individuals⁴⁴⁻⁴⁷ indicates the existence of high-risk groups. Therefore, there could be specific host characteristics that disturb the osseointegration process, like genetic factors. However, few studies have focused on this point.

Wilson & Nunn⁴⁸ (1999) assessed the presence of an IL-1 composite genotype, comprising allele T of IL-1A (-889) and IL-1B (+3953) polymorphisms⁴⁹ in 27 patients who had failed implants or experienced 50% of bone loss. Their analysis failed to provide a positive correlation between IL-1 genotype and the implant loss. However, these results might have been influenced by variables, such as the presence of smokers and the existence of late and early failure implants in the same sample. They found that smoking is such a strong risk factor (almost 2.5) for implant failure that could overcome the effect of IL-1 genotype. Rogers et al.⁵⁰ (2002) also found no association between the IL-1 composite genotype and the failure of dental implants. Recently, it has been demonstrated that IL-1

composite genotype alone does not appear to influence the risk for peri-implant bone loss, but the risk was significantly higher when the IL-1 genotype was associated with smoking⁵¹.

This is the first study that analyzed the TNF- α (G-308A) polymorphism in patients who had suffered early implant failures. The lack of association in our results could be a consequence of our limited sample size. In fact, the early implant failure is not a frequent event and when smokers are ruled out the study population is substantially reduced.

Other possible explanation for our negative results is that we analyzed the independent role of one promoter polymorphism in the TNF- α gene. Since the TNF- α gene resides within the class III region of the major histocompatibility complex (MHC), it is a component of the human leukocyte antigen (HLA) gene complex. The allele A of the TNF- α (-308) polymorphism is linked to HLA A1-B8-DR3-DQ2 haplotype⁵², which is associated with high TNF- α production^{17,53}. In view of the intimate and possible cross-regulatory effect of MHC class III genes on TNF- α activity, it appears unlikely that the TNF- α (-308) polymorphism plays a pivotal role in the failure process.

If really exists any genetic influence on implant failures, it could operate through other mechanisms that might be polymorphisms in different pro-inflammatory cytokine or growth factor genes. Other polymorphisms could be more important than the TNF- α (G-308A) and should be analyzed in attempt to clarify which factors could indeed be implicated in the loss of implants. It is also possible that the critical step is not at the level of cytokine production but at a later stage of bone formation, such as calcification of bone organic matrix.

Considering the whole studied population, we found an allele A prevalence of 12.1%. It was much lower than the prevalence of 28.5%⁴⁹ and 27%⁵⁴ reported for European Caucasians. These differences between those populations reflect that the results we have reported, while true for the Brazilian population, may be different in others.

Although we have found no association between the TNF- α (-308) polymorphism and early failure of implants, the role of this cytokine in the failure mechanism remains to be determined. Dental implants are not physiologically inert. Different types of implants can stimulate peripheral mononuclear cells to produce IL-1 β and TNF- α ⁵⁵. Moreover, high levels of TNF- α released from macrophages exposed to titanium particles played an important role in the inhibition of bone formation, suggesting that this cytokine has a significant part in the abnormal bone metabolism that occurs with implant loss⁵⁶.

Conclusion

The discovery of genetic markers related to implant failure would be of great value and clinical importance due to the possibility of a better understanding of failure mechanisms, a more adequate patient selection and development of preventive measures or individual therapies.

In conclusion, we did not find an association between the TNF- α (G-308A) gene polymorphism and early implant failure, suggesting that the presence of this polymorphism alone does not predispose to the loss of dental implants. In spite of the negative results presented by this and other studies, further investigations in genes of other inflammatory

mediators should be conducted on different populations to provide more conclusive evidence of the genetic influence in dental implant failure.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by CNPq grant 131363/2002-6 and FAPESP grant 01/11920-6.

REFERENCES

1. Adell R, Eriksson B, Lekholm U, et al. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:347–359.
2. Lekholm UGJ, Henry P, Higuchi K, et al. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:636–645.
3. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106:527–551.
4. El Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part I. *Implant Dent* 1999;8:173-185.
5. Parfitt AM. The two faces of growth: benefits and risks to bone integrity. *Osteoporos Int* 1994;4:382-398.
6. Horowitz MC, Lorenzo JA. Local regulators of bone. 1st ed. New York: Academic Press, 1996:687-700.

7. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989;7:625-655.
8. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452.
9. Manogue KR, Van Deventer SJH, Cerami A. Tumor necrosis factor or cachectin. 1st ed. New York: Academic Press, 1991:241-256.
10. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, et al. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J Periodontal Res* 1989;24:207-213.
11. Elias JA, Gustilo K, Baeder W, et al. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987;138:3812-3816.
12. Chaudhary LR, Spelsberg TC, Riggs BL. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha: lack of regulation by 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 1992;130:2528-2534.
13. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986;319:516-518.
14. Van Der Pluijm G, Most W, Van Der Wee-Pals L, et al. Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on osteoclast development and subsequent resorption of mineralized matrix. *Endocrinology* 1991;129:1596-604.

15. Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, et al. Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology* 1989;124:1424-1427.
16. Feldman M. TNF- α : a pivotal role in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992;6:485-516.
17. Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD. Heritable major histocompatibility complex class I is associated differences in production of tumor necrosis factor- α relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1233-1237.
18. Zinman B, Hanley AJG, Harris SB. Circulating tumor necrosis factor- α concentrations in a native canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:272-278.
19. Galbraith GM, Steed RB, Sanders JJ, et al. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol* 1998;69:428-433.
20. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, et al. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 1991;62:504-509.
21. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J, et al. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol* 1990;35:431-434.

22. Wilson AG, Di Giovine FS, Blakemore AI, et al. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992;1:353.
23. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-399.
24. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3195-3199.
25. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, et al. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995-96;46:32-41.
26. Perry RT, Collins JS, Wiener H, et al. The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22:873-883.
27. Danis VA, Millington M, Hyland V, et al. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1995; 12:127-133.
28. Rood MJ, Van Krugten MV, Zanelli E, et al. TNF -308 and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:129-134.
29. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, et al. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002;10:82-85.

30. Heijmans BT, Westendorp RG, Droog S, et al. Association of the tumour necrosis factor alpha -308G/A polymorphism with the risk of diabetes in an elderly population-based cohort. *Genes Immun* 2002;3:225-228.
31. Kao RT, Curtis DA, Richards DW, et al. Increased interleukin-1 beta in the crevicular fluid of diseased implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10: 696–701.
32. Panagakos FS, Aboyoussef H, Dondero R, et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:794–799.
33. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:32–42.
34. Schwartz Z, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Bone regulating mechanisms on implant surfaces. 1st ed. Chicago: Quintessence Publishing, 1999:41-54.
35. Van Der Linden MW, Huizinga TW, Stoeken DJ, et al. Determination of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 production in a whole blood stimulation system: assessment of laboratory error and individual variation. *J Immunol Methods* 1998;218:63-71.
36. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al. A Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:1912-1913.
37. Trevilatto PC, Line SRP. Use of Buccal Epithelial Cells for PCR Amplification of Large DNA Fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18: 6-9.
38. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:458-463.

39. Sanguinetti CJ, Dias EM, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 1994;17:915-919.
40. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998;106:721–764.
41. Santos MCLG, Campos MIG, Line SRP. Early dental implant failure: a review of literature. *Braz J Oral Sci* 2002;1:103-111.
42. El Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part II. *Implant Dent* 1999;8:265-277.
43. Deas DE, Mikotowicz JJ, Mackey SA, et al. Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. *Implant Dentistry* 2002;11:235-242.
44. Weyant RJ, Burt BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *J Den Res* 1993;72: 2–8.
45. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral and Maxillofac Implants* 1995;10:33–42.
46. Deem LP, Bassiouny MA, Deem TE. The sequential failure of osseointegrated submerged implants. *Implant Dent* 2002;11:243-248.
47. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, et al. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:462-467.
48. Wilson TGJ, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999;70:724–729.

49. Kornman KS, Crane A, Wang HY, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clinl Periodontol* 1997;24:72–77.
50. Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants? *J Periodontol* 2002;37:37-41.
51. Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, et al. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:10-17.
52. Wilson AG, Vries N, Pociot F, et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;117:557-560.
53. Abraham LJ, French MAH, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 1993;92:14-18.
54. Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, et al. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transpl Immunol* 1998;6:101-106.
55. Perala DG, Chapman RJ, Gelfand JA, et al. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J Periodontol* 1992;63:426-430.
56. Tsutsui T, Kawaguchi H, Fujino A, et al. Exposure of macrophage-like cells to titanium particles does not affect bone resorption, but inhibits bone formation. *J Orthop Sci* 1999;4:32-38.

Table 1. Baseline clinical parameters of the subject population (n=66).

Parameters	Control group (n=38)	Test group (n=28)
Mean age	43.2	52.7
Gender (n)		
Female	20	15
Male	18	13

Table 2. TNF- α (-308) allele and genotype distribution in individuals with successful implants (control group) and patients who had experienced implant failures (test group).

	Control group	Test group	
	n=38 (%)	n=28 (%)	<i>p</i> value
Alleles			
Allele G	70 (92.1)	54 (96.4)	
Allele A	06 (7.8)	2 (3.5)	0.4635
Genotypes			
G/G	32 (84.2)	26 (92.8)	
A/A	0 (0)	0 (0)	0.4445
G/A	6 (15.7)	2 (7.1)	