



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



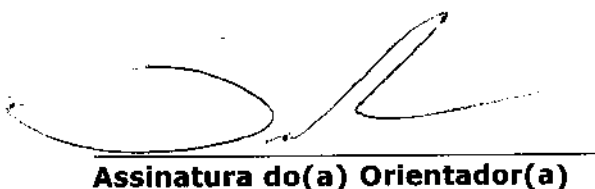
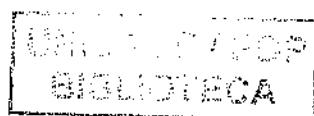
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Mayra de Faria França Leite

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Ano de Conclusão do Curso: 2009

A handwritten signature in black ink, appearing to be "S. Line".

Assinatura do(a) Orientador(a)

12302

Mayra de Faria França Leite



TCC/UNICAMP
L536a
FOP

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE DA MMP-1 E PERDA DE IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP,
para obtenção do Diploma de Cirurgiã – Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line.

Piracicaba

2009

Unidade - FOP/UNICAMP

7CC/UNICAMP

L536a Ed.

Vol. Ex.

Tombo 4951

C ☐ D ☒

Proc. 16P-134/10

Preço R\$ 11,00

Data 12/08/10

Registro 771526

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

L536a

Leite, Mayra de Faria França.

Associação entre polimorfismos do gene da MMP-1 e perda de implantes osseointegrados. / Mayra de Faria França Leite. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

32f. : il.

Orientador: Sérgio Roberto Peres Line.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontologia. 2. Implantes dentários osseointegrados. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/top)

*Dedico este trabalho à minha querida mãe, o meu
grande exemplo de vida e superação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor incondicional, pela paciência e apoio em todos os momentos e decisões.

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line por ter proporcionado a minha entrada no mundo da pesquisa científica. Sempre muito atencioso e de uma inteligência ímpar.

Agradeço à minha co-orientadora Maria Christina pelo apoio, dedicação, compreensão e amizade.

Agradeço a todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Morfologia pela ajuda, aprendizados e bons momentos.

Agradeço a Deus, por ter me proporcionado conhecer pessoas tão queridas na graduação e principalmente no Departamento de Morfologia.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas.....	01
Tabelas.....	02
Resumo.....	03
Introdução.....	04
Anexo.....	10
Discussão.....	11
Conclusão.....	14
Referências.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-cético

Et al. = e outros

DNA = Ácido desoxirribonucléico

MMPs = Metaloproteases da matriz

PCR = Reação em cadeia da polimerase

Tris-HCL = Tris hidrocloreto

TABELAS

p.

Tabela 1: Baseline Clinical Parameters of the Subjects Population (n = 104).....	654
Tabela 2: Primer Sequences, PCR Conditions and Restriction Enzymes Used for Genotype for MMP-1 Polymorphism.....	655
Tabela 3: Distribution of the MMP-1 Allele and Genotype in the Control and Test Group.....	656
Tabela 4: Frequency of the Haplotype of the MMP-1 Gene in the Control Test Group.....	656

RESUMO

Apesar do alto índice de sucesso dos implantes dentais osseointegrados, estudos demonstram que falhas podem ocorrer. O fenômeno em cacho, no qual alguns pacientes sofrem múltiplas perdas, suporta a evidência de que a característica individual tem um papel importante na falha da osseointegração, entretanto, pouco se sabe sobre a influência genética na susceptibilidade a perda precoce de implantes osseointegrados. Polimorfismos são variações genéticas encontradas na população, consideradas dentro da normalidade, que podem tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia. Polimorfismos em genes de mediadores inflamatórios como MMPs podem alterar a expressão dessas proteínas e estão relacionados à diversas patologias. O objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de polimorfismos em promotores do gene que transcrevem a MMP-1 (posições -1607 e -519) correlacionando-os com a perda precoce de implantes osseointegrados. Os voluntários foram divididos em dois grupos: *teste*, 44 pacientes com perda precoce de implantes e *controle*, 60 pacientes com implantes osseointegrados funcionais. O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, sendo amplificado por PCR, digerido por RFLP e analisado por eletroforese. A análise estatística foi realizada através das Simulações de Monte Carlo, ao nível de significância de 5%. O programa ARLEQUIN foi utilizado para verificar combinações de haplótipos.

INTRODUÇÃO

As evidências clínicas da osseointegração revolucionaram a implantodontia, tornando os implantes osseointegrados a alternativa mais estética e funcional para diversas situações de edentulismo. Apesar da osseointegração apresentar resultados previsíveis, reproduzíveis e estáveis ao longo do tempo (Pinto *et al.*, 2000), garantindo um alto índice de sucesso no tratamento com implantes (Adell *et al.*, 1990; Lekholm *et al.*, 1999), falhas ainda ocorrem.

Do ponto de vista biológico, Branemark (1996) definiu a osseointegração como a presença de tecido ósseo neoformado em íntima aposição com a superfície do implante, sendo que ao nível de microscopia óptica não se deve observar interposição de tecido fibroso. Logo, é estabelecida uma conexão estrutural e funcional direta, capaz de suportar cargas fisiológicas normais sem que ocorra deformação excessiva ou rejeição. Portanto, é óbvio que a interação entre o tecido ósseo e a superfície do implante é o principal fator responsável pelo sucesso do tratamento com implantes osseointegrados.

O mecanismo de osseointegração é muito similar à cicatrização óssea primária. Dessa maneira, após o trauma cirúrgico ocorre um processo inflamatório, no qual uma cascata de mediadores promove alterações circulatórias e a formação de um hematoma. Em seguida, se estabelece uma regeneração, com formação de tecido ósseo. Numa terceira etapa, ocorre a maturação da ferida por mecanismo de remodelação óssea, o qual é influenciado pelas pressões oclusais (Cotran *et al.*, 1994).

A falha na osseointegração se dá quando no lugar da regeneração acontece um processo de reparo, no qual citocinas orientam a migração e proliferação de fibroblastos culminando com a substituição do tecido de granulação, inicialmente formado, por uma cicatriz avascular composta por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e outros componentes da matriz extracelular (Cotran *et al.*, 1999). Essas citocinas ainda sinalizam para diversos tipos celulares estimulando a produção de prostaglandinas e metaloproteases da matriz, as quais estão associadas à degradação de tecido ósseo e conectivo (Greenstein & Hart, 2002). Assim, na falha de implantes ocorre um processo de reparo, sendo que a

formação de uma cápsula de tecido conjuntivo promove a mobilidade do implante e conseqüentemente a necessidade de removê-lo.

A falha biológica dos implantes está relacionada à incapacidade do hospedeiro em estabelecer ou manter a osseointegração e pode ser dividida em precoce, quando a osseointegração não ocorre, e tardia, quando ocorre uma ruptura na estabilização da osseointegração. Entretanto, essa divisão apresenta limitações, uma vez que existe dificuldade clínica em determinar se a osseointegração realmente ocorreu. (Esposito *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1999). Uma maneira prática de classificar a perda de implante é caracterizar como precoce aquela que ocorre antes da instalação da prótese e tardia aquela que acontece após o implante ser submetido a cargas oclusais (Esposito *et al.*, 1999).

A literatura (Askary *et al.*, 1999a; Askary *et al.*, 1999b; Pinto *et al.*, 2000) demonstra que diversos fatores podem estar associados com a falha de implantes osseointegrados, sendo classificados em exógenos (relacionados ao operador ou ao biomaterial) e endógenos (relacionados ao hospedeiro e subdivididos em locais ou sistêmicos). Forças oclusais excessivas e infecção (periimplantite) são os principais fatores associados à perda tardia, enquanto que o trauma cirúrgico excessivo, carga prematura e contaminação bacteriana estão relacionados à perda precoce (Ekfeldt *et al.*, 2001). Alguns autores, ainda sugerem que o volume e a qualidade óssea são fatores fortemente associados a esse tipo de fracasso (Friborg *et al.*, 1991; Hutton, 1995). Entretanto, um pequeno número de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (Deas *et al.*, 2002).

A ocorrência de insucesso no tratamento com implantes parece não estar aleatoriamente distribuída na população; indivíduos que perderam um implante são mais propensos a sofrerem outras perdas, é o chamado fenômeno em cacho (Weyant & Burn, 1993; Hutton *et al.*, 1995; Tonetti, 2000). Dessa maneira parece existir um grupo de risco, sugerindo que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrados. O desafio atual no tratamento com implante está na habilidade em detectar pacientes de risco. Dessa maneira, o conhecimento da etiologia e de fatores associados à falha de implantes pode ajudar no reconhecimento desses pacientes e auxiliar o desenvolvimento de um tratamento adequado em conjunto com estratégias de prevenção.

MEDIADORES INFLAMATÓRIOS X IMPLANTES OSSEOINTEGRADOS

No sítio de implantação, como qualquer sítio cirúrgico, ocorre uma reação inflamatória inicial em resposta ao trauma cirúrgico, entretanto, as características do material implantado podem influenciar essa resposta numa etapa posterior. Sabe-se que imediatamente após a implantação forma-se uma camada de componentes orgânicos e inorgânicos do plasma em torno do implante (principalmente proteínas como fibronectina e albuminas), na qual se ligam células mesenquimais progenitoras. Essas células liberam e ativam diversas citocinas e fatores de crescimento que controlam a inflamação e estimulam a proliferação e diferenciação de células em osteoblastos e osteoclastos, além de sintetizar uma rede de colágeno que funciona como suporte para o processo de reparo (Schwartz *et al.*, 1997).

Além disso, foi demonstrado que os constituintes metálicos dos implantes podem estimular a produção de níveis aumentados de citocinas tornando exacerbada a resposta do hospedeiro (Perala *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 1996; Tsutsui *et al.*, 1999). Durante a regeneração óssea, as células próximas à superfície do implante parecem ter a capacidade de orquestrar a atividade das células mais afastadas do defeito ósseo, produzindo fatores relacionados à inflamação, bem como, estimulando o metabolismo ósseo e a deposição de matriz (Schwartz *et al.*, 1997). As características do material implantado influenciando a quantidade e variedade celular que se aderem ao implante regem uma resposta imune que envolve diversos tipos celulares, como: macrófagos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos e osteoclastos. Quando exacerbada essa resposta pode destruir o tecido periimplantar (Lekholm *et al.*, 1986; Seymour *et al.*, 1989). A ativação dessas células culmina com a síntese e liberação de citocinas (Dongari-Bagtzoglo *et al.*, 1998; Gaiet *et al.*, 1998) e mediadores lipídicos (Salvi *et al.*, 1998), os quais medeiam o processo inflamatório e osteolítico.

Estudos prévios têm demonstrado que proteinases (Apse *et al.*, 1989; Ingaman *et al.*, 1994, Teronen *et al.*, 1997) estão presentes no fluido sulcular periimplantar e parecem ter um importante papel na patogênese da falha de implantes (Teronen *et al.*, 1997). A mensuração desses mediadores inflamatórios pode monitorar o *status* de saúde do implante e auxiliar na compreensão da atividade da doença no tecido periimplantar.

METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR

As metaloproteases da matriz (MMPs) compreendem uma família de enzimas que apresentam especificidade pelas macromoléculas da matriz extracelular. A família das metaloproteases é formada por pelo menos vinte membros em humanos que exibem similaridades estruturais e funcionais. As metaloproteases são secretadas na forma de zimógeno e como um complexo enzima-inibidor (Stricklin *et al.*, 1983; Emonar & Grimaud, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (Van Wart e Birkedal-Hansen, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as metaloproteases é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com dois resíduos de histidina presentes no domínio catalítico da molécula tem importância crucial para o funcionamento adequado das metaloproteases (Souza *et al.*, 2000). Os dois átomos de cálcio conferem uma estabilidade para a estrutura terciária da proteína (Dioszegi *et al.*, 1995).

As metaloproteinases representam a maior classe de enzimas responsável pelo metabolismo da matriz extracelular (Kerrigan *et al.*, 2000), contribuindo para degradação e remodelação do colágeno de tecidos injuriados (Birkedal-Hansen, 1993). Elas são secretadas por células inflamatórias em resposta a estímulos como citocinas e lipopolisacarídeos (Birkedal-Hansen, 1993). As MMPs desempenham papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, como na involução pós-parto (Weeks *et al.*, 1976), na inflamação através da migração leucocitária (Knauper *et al.*, 1993), na osteoartrite (Vijaykumar *et al.*, 1995), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástase (Autio-Hermainen *et al.*, 1993), na doença periodontal (Birkedal-Hansen, 1993; Souza *et al.*, 2003) e na reabsorção óssea (Okada *et al.*, 1995).

As metaloproteases da matriz se organizam em três distintos e bem conservados domínios estruturais: pró-peptídios amino terminal, domínio catalítico e domínio Carboxi-terminal e apesar de possuírem grande semelhança estrutural apresentam diferentes subclasses, como: collagenases intersticiais, gelatinases, estromelisinases, MMP de membrana, além da matrilisina, estromelisina e

enamelinina. Esta classificação baseia-se na especificidade ao substrato. As collagenases intersticiais são as mais específicas, foram as primeiras a serem descritas (Gross & Nagai, 1962) e, durante as últimas décadas, têm sido objeto de muitos estudos que versam sobre sua expressão, distribuição, estrutura química e molecular em processos normais e patológicos. Existem três tipos de collagenases até hoje descritas, que apesar de exibirem grande semelhança estrutural e de especificidade são codificadas por genes distintos. A do primeiro tipo, MMP-1 é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, macrófagos, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos (Bikedal-Hansen, 1993) e expressa amplamente entre os tecidos. Ela possui um proeminente papel na degradação do colágeno, pois é a única enzima capaz de clivar colágeno tipo I, II, III, VII, VIII e X, que são os mais abundantes componentes da matriz extracelular (Dunleavy *et al.*, 2000), tornando estas moléculas susceptíveis à ação de outras enzimas (Souza, 1993). As collagenases intersticiais iniciam a reabsorção óssea pela geração de fragmentos de colágenos que ativam osteoclastos (Holliday *et al.*, 1997).

A regulação da atividade proteolítica das metaloproteases ocorre a nível extracelular através de proteínas inibidoras específicas de tecido, os TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Herron *et al.*, 1986). Estes inibidores estão distribuídos pelos tecidos e fluidos e são secretados por diversos tipos celulares. Alterações nos níveis de síntese entre TIMPs e MMPs pode levar a um desequilíbrio na taxa de degradação da matriz extracelular, podendo causar destruição anormal da matriz (MacNaul *et al.*, 1990). Além disso, os genes que transcrevem as MMPs respondem em níveis de transcrição a diferentes citocinas (Fabunmi *et al.*, 1996, Kondapaka *et al.*, 1997).

POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Polimorfismos são pequenas variações genéticas encontradas em mais de 1% da população e consideradas biologicamente normais. Geralmente os polimorfismos são caracterizados por uma simples troca de nucleotídeos (SNPs *singles nucleotide polymorphisms*), porém podem ser representados por deleções ou inserções de bases. Os polimorfismos são considerados funcionais quando promovem alteração na expressão do gene e dessa forma podem tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia (Thompson *et al.*, 1991).

O gene da MMP-1 está localizado no cromossomo 11q22.3 (Gene ID 4312), um polimorfismo caracterizado pela inserção de uma base guanina (G) na posição -1607, cria dois alelos diferentes (1G ou 2G), sendo que o alelo 2G tem sido relacionado com o aumento da expressão desse gene (Rutter *et al.*, 1998). Recentemente foi descrito um polimorfismo na posição -519 desse mesmo gene, onde existe uma troca de adenina (A) por guanina (G) (Jurajda *et al.*, 2002).

Em prévio projeto de mestrado financiado pela FAPESP (processo 01/11920-6) foi demonstrado que o polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 está fortemente associado à perda precoce de implantes osseointegrados em pacientes não fumantes. O alelo 2G foi observado numa frequência muito grande em pacientes com perda precoce de implante (Santos *et al.*, 2004). Esse alelo aumenta a transcrição do gene e potencializa o nível da expressão dessa proteína (Rutter *et al.*, 1998) fornecendo a base molecular para explicar a intensa degradação da matriz extracelular, o que pode explicar o aumento na susceptibilidade na falha da osseointegração. Esse polimorfismo também está associado à periodontite crônica na população brasileira (Souza *et al.*, 2003).

Alguns sítios polimórficos podem ser herdados em combinação, são os chamados haplótipos. Dessa maneira, a combinação de dois ou mais *locis* polimórficos podem influenciar determinada patologia. Em recente estudo da região promotora do gene da MMP-1 foi associado os polimorfismos na região -1607 (1G/2G), -519 (A/G), -422 (A/T) com periodontite crônica na população tcheca. O resultado obtido foi diferente do estudo de Souza *et al.* (2003), sendo que o polimorfismo 1G/1G predominou em pacientes não fumantes com periodontite crônica. Nesse estudo a combinação genotípica nas posições -1607, -519 e -422 (1G/2G – AA – AT) estava mais freqüente no grupo de pacientes com periodontite, enquanto outra combinação significativa (1G/2G – AA – TT) foi mais freqüente no grupo de referência (Hollá *et al.*, 2004). Jurajda *et al.* (2002) também observaram relação entre os polimorfismos -1607 e -519 do gene da MMP-1, onde o alelo A na posição -519 parece estar em combinação com o alelo 2G da posição -1607.

ANEXO

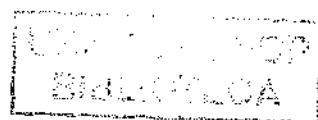


Table 1 Baseline Clinical Parameters of the Subject Population (n = 104)

	Control group (n = 60)	Test group (n = 44)
Mean age/range	46/21-71	45.6/18-73
Gender		
Female (%)	54.83	53.06
Male (%)	45.17	46.94
Maxillary implants (%)	43.48	38.92
Maxillary failure (%)	-	21.70
Mandibular implants (%)	56.52	61.98
Mandibular failure (%)	-	78.30
Mean time of successful implants/ range of failure after surgery	2.5/9-72 mo	5.5/1-12 mo**

*Mean time of failure after dental implant placement.

Fibroblast-type collagenase (MMP-1) is the interstitial collagenase expressed most widely among tissues and therefore plays a prominent role in collagen degradation.¹⁷ MMP-1 degrades types I, II, III, and IX, which are the most abundant protein components of extracellular matrix.^{9,18} Interstitial collagenase allows osteoblasts to initiate bone resorption by generating collagen fragments that activate osteoclasts.¹⁹ Normally, expression of MMP-1 is low, but it is readily induced by phorbol esters, growth factors, and inflammatory cytokines.²⁰ Overexpression of MMP-1 is associated with several pathologic conditions.²¹

Insertion of a guanine at position -1607 of human MMP-1 gene creates the 2G allele, which has been shown to increase transcriptional activity.²² The presence of this allele has been associated with the development of ovarian cancer,⁵ endometrial carcinomas,²³ changes in bone mineral density,¹⁷ the premature rupture of fetal membranes,⁸ and chronic severe periodontitis.⁹ Another polymorphic site in MMP-1, A-519G substitution has been reported.²⁴ Jurajda et al²⁴ observed linkage between these 2 polymorphisms. The A allele at -519 was more often found with the 2G allele at -1607.²⁴

The finding of genetic markers related with early implant failure could allow the identification of individuals susceptible to implant loss. The purpose of this study was to investigate a possible relationship between 2 polymorphisms in the promoter of MMP-1 gene (G-1607GG and A-519G) and early failure of osseointegrated oral implants.

MATERIALS AND METHODS

Subject Selection

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

subjects. A sample of 104 nonsmoking subjects (46 samples from a previous study⁹ older than 18 years of age were recruited for study from the patient pool at the Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil. The subjects were randomly recruited. All subjects were in good general and oral health and did not have any of the following exclusion criteria: a history of diabetes or osteoporosis, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, or a history of any disease known to severely compromise immune function. Patients with early loading or regenerative surgery, such as bone grafting, and those who had had postsurgical complications, such as infection, were also excluded. All patients studied had been treated with implant systems that followed Brånemark 2-stage protocol: Biomet/3i (Palm Beach Gardens, FL) and Conexão Implant System and Prosthesis (São Paulo, SP, Brazil). No significant differences were observed in male-female ratio or maxilla-mandible implant ratio between the control and test groups. The baseline clinical parameters for the subject population are presented in Table 1. Subjects were divided into two groups:

- Control group: 60 patients with 1 or more healthy implants. These patients had at least 1 implant that had been implanted for a minimum of 9 months.
- Test group: 44 patients who had suffered 1 or more early implant failures. The implants were considered early losses if they presented mobility and/or pain before or during abutment connection and needed to be removed.

Sampling

The sampling of epithelial buccal cells was performed as described by Trevilatto and Line.²⁵ Briefly, 104 individuals undertook a mouthrinse containing 5 mL 3% glucose for 2 minutes. Following the mouthrinse, a sterile wood spatula was used to scrape oral mucosa. The tip of the spatula was then dipped into the retained mouthrinse solution. Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended in 500 μ L of extraction buffer (10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 5 mol/L EDTA, 0.5% SDS). The samples were then frozen at -20°C until used for DNA extraction.

DNA Extraction

After being defrosted, samples were incubated overnight with 100 ng/mL proteinase K (Sigma Chemical, St Louis, MO) at 52°C with agitation. DNA was then purified by sequential phenol/chloroform extraction

Table 2 Primer Sequences, PCR Conditions and Restriction Enzymes Used for Genotype for MMP-1 Polymorphisms

Gene	Primer sequences (5'-3')	Annealing temperature	Restriction endonuclease
MMP-1 (-1607)	F:TCGTGAGAATGCTTCCCAT R:TCTTGGATTGATTGAGATAAGTGAAATC	55°C	XmnI
MMP-1 (-519)	F: CATGGTGCTATCGCAATAGGGT R: TGCTACAGGTTTCTCCACACAC	45°C	KpnI

and salt/ethanol precipitation. DNA was estimated by measurements of optical density (OD) 260/280.

Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonucleases Digestion

Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in a total volume of 50 μ L, containing 500 ng genomic DNA; 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50 mmol/L KC; 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 1 μ L of each primer; 200 mmol/L each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; and 4 units of Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The PCR products were then digested with 1 unit of the appropriate enzyme at 37°C overnight. The primer sequences, PCR conditions, and restriction enzymes are detailed in Table 2.

Gel Electrophoresis

The entire digest was mixed with 3 μ L of loading buffer and electrophoresed on a 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel at 20 mA. The gel was silver staining by DNA Silver Staining Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Statistical Analysis

The significance of the differences in observed frequencies of polymorphism in both groups was assessed by the χ^2 test. $P < .05$ was considered statistically significant. Linkage combination was assessed by the ARLEQUIN program (Schneider et al, 2000). The Clump program (Sham and Curtis) was used to assess differences in haplotype frequencies between the control and test groups.

RESULTS

Two mismatches were introduced in the reverse primer of the MMP-1 gene G-1607GG position annealed to the proximity of the polymorphism,¹⁸ creating a recognition sequence (5'-GAANNNTTC-3') for the restriction endonuclease *XmnI* when the DNA template contains 1G (but not 2G) at the polymorphism site. Thus, *XmnI* digests the 1G allele, creating 2 fragments of 89bp and 29bp. In A-519G posi-

tion, the *KpnI* enzyme digestion cleaves the PCR products in 2 fragments of 176bp and 24bp when the polymorphism site contains allele A (but not G).

There was a significant difference in the presence of the different genotype between the control group and test group for the G-1607GG position ($P = .011$). In the control group, the GG/GG genotype was observed with a frequency of 62%, while in the test group (patients with early failure of dental implants) 55% were heterozygous (G/GG genotype). However, the most frequent allele was G in both groups: 75% in the control group and 62% in the test group ($P = .05$). No significant differences were observed in the genotypes and alleles to the A-519G polymorphism between the 2 groups ($P = .064$ and $P = .124$, respectively). The genotype A/G was observed in 50% of the control group, whereas this same genotype was found in 68% of the test group. The allele A was found in 62% of the control group and 50% of the test group. The frequencies of different alleles and genotypes of the MMP-1 gene are shown in Table 3.

The distribution of the haplotypes arranged as alleles and genotypes showed a significant difference between the control and test groups ($P = .031$ and $P = .002$, respectively). The most frequent haplotype allele in both groups was AG, but in the control group only 12.5% of the patients were GGG, while in the test group 28.8% were GGG. The haplotype genotype AG/GG was observed in 36.7% of individuals in the control group, while in the test group 35.6% were AG/GGG (Table 4).

DISCUSSION

Implant losses can arbitrarily be divided into early losses (ie, when osseointegration fails to occur) and late losses (ie, when the achieved osseointegration is lost after a period of function).²⁶ One way to discriminate between early and late losses is to include all failures occurring before prosthesis placement in the early group and those occurring after functional loading in the late group, if implants are not immediately loaded. Implant loss can be attributed to bio-

Table 3 Distribution of the MMP-1 Allele and Genotype in the Control and Test Group

MMP-1	Control Group		Test Group		P
	n	%	n	%	
-1607 Allele	120		88		
G	90	75.00	54	61.36	(qui-
GG	30	25.00	34	38.63	quadrado)
Genotype	60		44		
G/G	37	61.66	15	34.06	(qui-
					quadrado)
GG/GG	07	11.66	05	08.33	.011
G/GG	16	26.66	24	54.54	
-519 Allele	120		88		
A	74	61.66	44	50.00	
G	46	38.33	44	50.00	.124
Genotype	60		44		
A/A	22	36.66	07	15.90	χ^2
G/G	08	13.33	07	15.90	.064
A/G	30	50.00	30	68.18	

Table 4 Frequency of the Haplotype of the MMP-1 Gene in the Control and Test Group

Haplotype	Control Group		Test Group		P
	n	%	n	%	
A-519C/G-1607GG					
Allele					
AG	59	49.2	35	38.9	(Clump)
AGG	15	12.5	09	10.0	.031
GG	31	25.8	20	22.2	
GGG	15	12.5	26	28.9	
Genotype					
AG/GGG	07	11.7	16	35.6	(Clump)
AG/AGG	08	13.3	04	08.8	.002
AG/GG	22	36.7	10	22.2	
AG/AG	11	18.3	03	06.7	
AGG/GGG	01	01.7	04	08.8	
AGG/AGG	03	05.0	00	00.0	
GG/GGG	01	01.7	06	13.3	
GG/GG	04	06.7	02	04.4	
GGG/GGG	03	05.0	00	00.0	

logical, microbiological, or biomechanical factors, but the cause and mechanism of the early implant failure are still obscure. The cluster phenomenon, multiple implant failures in the same subject, supports the evidence that individual characteristics play an important role in the early failure process.²⁷⁻²⁹ However, little is known about the influence of genetic susceptibility on osseointegration.

An abnormal immune response involving different cell types such as macrophages, polymorphonuclear neutrophils, T and B lymphocytes, endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, osteoclasts, and osteoblasts can destroy peri-implant tissues.³⁰⁻³² If activated, these cells can synthesize and release cytokines^{33,34} and lipid mediators,³⁵ which mediate both the inflammatory and the osteolytic processes. Overall, collagenase is likely to cause increased proteolytic tissue destruction in periprosthetic tissue.³⁶ Since elevated levels of these mediators are present in diseased implant sites, their analysis may provide an effective monitoring of the disease around dental implants. Genetic polymorphisms probably influence the osseointegration process through the accumulated effect of multiple polymorphisms. To understand the importance of polymorphisms of each allele, it is important to analyze the relative contribution of each polymorphism to the disease phenotype.³⁷

Recent studies have failed to present genetic association in implant loss.³⁸⁻⁴¹ Wilson and Nunn³⁸ assessed the impact of composite genotype status to IL-1 on implant retention among patients who were smokers or nonsmokers. The authors concluded that no increased risks for implant failure could be attributed to

polymorphisms IL-1 genotype-positive. Nevertheless, the presence of smokers in the study group would possibly mask the genetic influence, since it is known that smoking is a strong risk factor for early implant failure—smokers had a 3% greater chance of losing an implant compared to nonsmokers.³⁷ Feloutzis et al⁴¹ 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 smoking.

A previous report showed that the G-1607GG polymorphism in MMP-1 gene is strongly associated with the early implant failure in nonsmokers.²⁷ The MMP-1 promoter polymorphisms G-1607GG was also associated with increased susceptibility to chronic periodontitis in Brazilian patients.⁹ In this study, the GG/GG phenotype in -1607 polymorphism of MMP-1 gene was associated with early implant failure in nonsmokers. The G/G genotype was observed in 62% of the control group, while it was found in 34% in the test group. Patients bearing this genotype are more likely to attain successful implant osseointegration. The present study also showed that A-519G polymorphism of MMP-1 gene is not associated with the early implant failure. One possible explanation could be the size of the sample. In fact, the small *P* value found in the genotype analysis (*P* = .064) can be attributed to the limited sample size. Unfortunately, early implant failure is not a frequent event, and when smokers are ruled out, the study population is substantially reduced. Early implant failure associated strict exclusion criteria may indicate that these patients have a genetic predisposition. The present

work has the largest sample of implant-loss patients studied so far. Furthermore, the rate of implant loss in the dental service where the patients were recruited is less than 5%. Previous studies used from 39 to 90 patients but also included both smokers and non-smokers,³⁸⁻⁴¹ whereas the analysis presented here was performed in 104 nonsmoking subjects. Moreover, the effect of these promoter polymorphisms could be buffered by polymorphisms present in the coding region of this gene or by polymorphisms in other genes that participate in the complex network of interactions mediating the inflammatory process at the periodontal region.

In this study, haplotypes arranged as alleles and genotypes were associated with implant loss. It suggests that a haplotype combination of polymorphisms in MMP-1 gene can influence the osseointegration process. A negative association with chronic periodontitis was observed when the Brazilian population was analyzed for the same haplotype combination.⁴² The data suggest a contribution of MMP-1 gene variation to interindividual variability in osseointegration.

An increasing number of studies have shown that a disease phenotype can be associated with a haplotype made up of polymorphisms that are not individually associated with the phenotype.⁴³⁻⁴⁵ The present study showed that risk of implant loss was associated with haplotypes derived from the G-1607GG and A-519G polymorphisms, although there was no association between the osseointegration and A-519G polymorphism individually.

It appears that there are at least 2 reasons that might explain why a phenotype can be associated with a haplotype but not with the individual polymorphisms that make up the haplotype. First, a functional effect on gene expression can be dependent on the interaction between 2 or more polymorphisms⁴⁶; second, haplotypes generally have a higher probability than individual polymorphisms of showing useful linkage disequilibrium with an unknown causal variant.⁴⁷ However, a complete explanation awaits analyses to characterize the nuclear proteins involved and their interactions.

Although no association was found between A-519G polymorphism and early implant loss, the role of MMP-1 in osseointegration is confirmed by haplotype combination associated with failure implant in nonsmokers and by the involvement of this cytokine in the inflammatory reaction and bone resorption, which are important in the genesis of implant failure. The results suggest that the MMP-1 gene can have a modifying effect on the osseointegration process and that patients carrying higher MMP-1 expression haplotypes are more likely to experience implant failure because of excessive degradation of fibrillar collagens.

CONCLUSION

On the basis of this study of 60 patients who experienced no implant failure and 44 patients who experienced implant failure, these results indicate that the polymorphism G-1607GG in the promoter of the MMP-1 gene could be a risk factor for early implant failure. This polymorphism could be used as a genetic marker for unsuccessful implants. Although the findings may suggest that A-519G polymorphism maker is not a predictor of the pathologic or clinical consequences of osseointegration, studies with larger sample size are needed to confirm this finding. This study suggests that haplotype G-1607GG and A-519G of MMP-1 may be associated with the osseointegration process. However, more studies are needed to investigate this finding.

The finding of genetic markers related with early implant failure could be of clinical value for precise and early identification of individuals at high risk to implant loss. It could lead to a more strict selection of patients and in the future, individual therapeutics could be developed, thereby increasing the implant success rates.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by FAPESP grant 04/10096-6.

REFERENCES

- Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark P-I, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990;5:347-359.
- Lekholm U, Gunne J, Henry P, et al. Survival of the Brånemark implant in partially edentulous jaws: A 0-10 year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:639-645.
- 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* 1998;106:527-551.
- Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, ed 5. Philadelphia: Saunders, 1991.
- Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, et al. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer Res* 1999;59:4225-4227.
- Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999;30:2612-2616.
- Lamblin N, Bateurs C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:43-48.
- Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem* 2002;277:6296-6302.

9. De Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB Jr, Line SRP. MMP1 promoter polymorphism: Association with chronic periodontitis severity in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003;30:154-158.
10. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. *J Orthod* 2000;27:227-233.
11. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
12. Teronen O, Kontinen YT, Lindqvist C, et al. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. *J Dent Res* 1997;76:1529-1537.
13. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: A comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodontol* 1989;24:96-105.
14. Ingman T, Kononen M, Kontinen YT, Siirila HS, Suomalainen K, Sorsa T. Collagenase, gelatinase and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implants and natural teeth. *J Clin Periodontol* 1994;21:301-307.
15. Ma J, Kittl U, Teronen O, et al. Collagenases in different categories of peri-implant vertical bone loss. *J Dent Res* 2000;79:1870-1873.
16. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 1997;46:310-319.
17. Yamada Y, Ando F, Niino N, Shimokata H. Association of a polymorphism of the matrix metalloproteinase-1 gene with bone mineral density. *Matrix Biology* 2002;21:389-392.
18. Dunleavy L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. *Matrix Biol* 2000;19:175-177.
19. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 1997;272:22053-22058.
20. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000;6:4823-4830.
21. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): Mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:391-411.
22. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998;58:5321-5325.
23. Nishioka Y, Kobayashi K, Sagae S, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinomas. *J Cancer Res* 2000;91:612-615.
24. Jurajda M, Muzik J, Izakovicova Hollo L, Vacha J. A newly identified single nucleotide polymorphism in the promoter of the matrix metalloproteinase-1 gene. *Mol Cell Probes* 2002;16:63-66.
25. Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:6-9.
26. 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.
27. Santos MCLG, Campos MIG, Line SRP. Early dental implant failure: A review of the literature. *Braz J Oral Sci* 2002;1:103-111.
28. Herrmann I, Lekholm U, Holm S, Karlsson S. Impact of implant interdependency when evaluating success rates: A statistical analysis of multicenter results. *Int J Prosthodont* 1999;12:160-166.
29. Herrmann I, Lekholm U, Holm S, Kultje C. Evaluation of patient and implant characteristics as potential prognostic factors for oral implant failures. *Int J Oral & Maxillofac Implants* 2005;20:220-230.
30. Adell R, Lekholm U, Rockler B, et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:39-52.
31. Lekholm U, Adell R, Lindhe J, et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II). A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:53-61.
32. Seymour GJ, Gemmell E, Lenz LJ, Henry P, Bower R, Yamazaki K. Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:191-198.
33. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontol* 1998;33:212-225.
34. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol* 1998;69:899-910.
35. Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC. Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells. *Infect Immun* 1987;55:2148-2154.
36. Abouyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:689-696.
37. Greensteing G, Hart TC. A critical assessment of interleukin-1(IL-1) genotype when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:231-247.
38. Wilson TG Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999;70:724-729.
39. Santos MCLG, Campos MIG, Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Mazzonetto R, Line SRP. Analysis of the transforming growth factor- β 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Implant Dent* 2004;13:262-269.
40. Campos MIG, Santos MCLG, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJB, Line SRP. IL-2 and IL-6 gene promoter polymorphisms and early failure of dental implants. *Implant Dent* 2005;14:391-396.
41. 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.
42. Astolfi CM, Shinohara AL, Silva RA, Santos MCLG, Line SRP, de Souza AP. Genetic polymorphism in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* (in press).
43. Putt W, Palmen J, Nicaud V, et al. Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: Gene and gene: Environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet* 2004;13:1587-1597.
44. Mannila MN, Eriksson P, Lundman P, et al. Contribution of haplotypes across the fibrinogen gene cluster to variation in risk of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005;93:570-577.
45. Linne Y, Dahlman I, Hoffstedt J. Beta1-adrenoceptor gene polymorphism predicts long-term changes in body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2005;29:458-462.
46. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138-18144.
47. Garner C, Slatkin M. On selecting markers for association studies: Patterns of linkage disequilibrium between two and three diallelic loci. *Genet Epidemiol* 2003;24:57-67.

DISCUSSÃO

Diversos fatores estão associados com a falha de implantes osseointegrados (Askary *et al.*, 1999a; Askary *et al.*, 1999b; Pinto *et al.*, 2000), no entanto, muitos pontos remanescem sem esclarecimento, principalmente quando se trata da perda precoce. O fenômeno em cacho, no qual alguns pacientes sofrem múltiplas perdas, suporta a evidência que a característica individual tem um papel importante na falha do implante. Dessa maneira, fatores como: fumo (Gorman *et al.*, 1994; Lindquist *et al.*, 1997; Wilson & Nunn, 1999), quantidade e densidade ósseas (Jaffin & Berman, 1991; Bryant, 1998; Stanford, 1999), diabetes (Shernoff *et al.*, 1994; Abdulwassie & Dhanrajani, 2002), tratamento quimioterápico (Schon *et al.*, 1996) e resposta imune debilitada (Kronstrom *et al.*, 2000), interferem no processo de osseointegração.

Alguns autores (Salonen *et al.*, 1993) ainda associam a perda precoce de implantes à idade avançada do paciente. Nesse estudo não foi observada influência da idade ou gênero sobre a osseointegração, concordando com a maioria dos achados na literatura (Ekfeldt *et al.*, 2001; Hutton *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1998).

Outro fator relacionado à perda de implante é a intensidade da força aplicada na segunda etapa cirúrgica durante a instalação do transmucoso (*abutment*). Estudos demonstram que a força excessiva nessa etapa pode provocar a ruptura de uma frágil interface osso-implante (Friberg *et al.*, 1991; Askary *et al.*, 1999a). Entretanto, em nosso estudo a grande maioria das perdas ocorreu antes da instalação do *abutment*, indicando que a intensidade da força aplicada durante sua colocação não foi importante nas perdas dos implantes na população estudada.

Como a maioria dos implantes perdidos estava localizada na região posterior da mandíbula, poder-se-ia suspeitar que o volume e densidade óssea nessa região tenham desempenhado algum papel na falha dos implantes, de acordo com os estudos de Friberg *et al.* (1991) e Hutton (1995). A camada cortical da mandíbula geralmente é densa e espessa e tende a se tornar mais estreita e porosa na região posterior. Somado a esse fato, a presença do canal mandibular também limita o volume ósseo deste local. Entretanto, a grande porcentagem de implantes na região posterior encontrada em nosso grupo controle, sugere que o volume e a

densidade óssea apenas não foram fatores causadores da perda de implantes; devendo existir fatores mais determinantes na falha da osseointegração.

Apesar dos esforços para eliminar ou minimizar fatores conhecidos de risco à perda de implante, falhas sem causas clinicamente reconhecidas ainda ocorrem. Tendo em vista que a diferenciação e função de células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) são dependentes de fatores locais e da expressão de mediadores inflamatórios como: MMP (Roodman, 1997a), torna-se válido avaliar a influência de fatores genéticos, que possam causar uma maior expressão desses mediadores, na falha do estabelecimento da osseointegração.

Polimorfismos em genes de MMP-1 estão relacionados com a hipersecreção dessa proteína (Rutter *et al.*, 1998) e associados à diversas doenças inflamatórias, inclusive a doença periodontal (Souza *et al.*, 2003b).

Esse estudo mostrou que o polimorfismo G-16072G apresentou preponderância do alelo G nos dois grupos, enquanto o genótipo 1G/1G predominou no grupo controle e o grupo teste apresentou maior prevalência do genótipo G/2G. Em contraste com estudo anterior (Santos, *et al.*, 2004) que observou o alelo 2G associado com um risco de perda precoce de implante, esse estudo sugere que o genótipo 1G/1G favorecer o processo de osseointegração, enquanto a heterozigose parece aumentar o risco para perda de implante. O alelo 2G aumenta a transcrição do gene e potencializa o nível da expressão da MMP-1 (Rutter *et al.*, 1998). Por outro lado, a presença do genótipo 1G/1G garante uma controlada produção da proteína protegendo o processo de osseointegração de uma intensa degradação da matriz extracelular. O maior número de pacientes no presente estudo torna-o mais confiável e demonstra a necessidade de um amplo grupo amostral em estudos de associação entre polimorfismos genéticos e patologias.

Já o polimorfismo A-519G do gene da MMP-1 não está associado à perda precoce de implantes osseointegrados na população estudada. O alelo A predominou no grupo controle, enquanto o alelo G predominou no grupo teste. Entretanto, o genótipo heterozigoto predominando tanto no grupo teste quanto no grupo controle. Esse polimorfismo não apresentou diferença estatisticamente significativa na distribuição alélica e genotípica quando comparadas as duas populações. Esse polimorfismo, apesar de modificar a expressão da proteína, parece não influenciar ou ter somente um efeito mínimo na falha de implantes osseointegrados. Outra explicação seria que esses polimorfismos podem ter seus

efeitos mascarados por polimorfismos em diferentes regiões do mesmo gene ou em outros genes que participam da complexa rede de mediadores inflamatórios da região periodontal. Dessa maneira, somente a presença desses polimorfismos não é um fator de risco genético para perda precoce de implantes.

Entretanto, a investigação de polimorfismos na MMP-1 deve ser considerada na falha de implantes, devido à importância dessas proteínas no processo de inflamação e reabsorção óssea que são os eventos mais importantes na falha de implantes. Na verdade, os polimorfismos genéticos provavelmente influenciam a osseointegração através do efeito acumulado de múltiplos polimorfismos, assim um polimorfismo pode ter seus efeitos acentuados ou mascarados por outro polimorfismo. Para entender a importância de cada alelo polimórfico é necessário avaliar a contribuição de cada polimorfismo no fenótipo da doença (Adamo *et al.*, 2001).

É importante salientar que os resultados aqui reportados poderiam ser diferentes quando analisados em populações etnicamente distintas, uma vez que, a origem étnica pode influenciar a frequência alélica (Mourant *et al.*, 1976) e é identificada como um fator significativo em diversas patologias.

A descoberta de marcadores genéticos relacionados à perda precoce de implantes possibilita a identificação de indivíduos susceptíveis ao insucesso e uma melhor compreensão do processo de osseointegração. Isso é de um valor clínico inestimável, uma vez que, uma seleção mais criteriosa poderia ser realizada e, no futuro, estratégias de prevenção e terapêutica individualizada poderiam ser desenvolvidas, visando modular a expressão de mediadores inflamatórios e dessa maneira aumentar a taxa de sucesso dos implantes.

CONCLUSÃO

O genótipo 1G/2G do polimorfismo na posição -1607 do gene da MMP-1 está associado com perda precoce de implantes osseointegrados na população estudada. Os resultados apresentados sugerem um papel ativo da MMP-1 na patogênese da falha de implante.

Esse polimorfismo poderá ser usado como um marcador genético para o insucesso de implantes.

O polimorfismo A-519G no gene da MMP-1 parece não estar associados com a perda precoce de implantes osseointegrados, não sendo um bom marcador genético de susceptibilidade a falha na osseointegração.

REFERÊNCIAS

1. Abdulwaisse H, Dhanrajani PJ. Diabetes mellitus and dental implants: a clinical study. **Implant Dent.** 2002; 11: 83-68.
2. Adamo CT, Mailhot JM, Smith AK, Borke JL. Connexin-43 expression in oral-derived osteoblasts after transforming growth factor-beta and prostaglandin E2 exposure. **J Oral Implantol.** 2001; 27: 25-31.
3. 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: 347-359.
4. Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. **J Periodontal Res.** 1989; 24: 96-105.
5. Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part I. **Implant Dent.** 1999a; 8: 173-185.
6. Askary AS, Meffert RM, Griffin T. Why do dental implants fail? Part II. **Implant Dent.** 1999b; 8: 265-277.
7. Autio-Harmainen H, Karttunen T, Hurskainen T, Hoyhtya M, Kauppila A, Try2Gvason K. Expression of 72 kDa type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. **Lab Invest.** 1993; 69: 312-321.
8. Branemark R. **A biomechanical study of osseointegration.** In-vivo measurements in rat, rabbit, dog and man. Göteborg: Göteborg University, 1996.
9. Brikedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol.** 1993; 64: 474-484.
10. Bryant SR. The effects of age, jaw site, and bone condition on oral implants outcomes. **Int J Prosthodont.** 1998; 11: 470-490.
11. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A.; 1999. p. 79-100.

12. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflammation and Repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Pathologic basis of Disease**. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994. p. 51-92.
13. Deas DE, Mikotowicz JJ, Mackey SA, Moritz AJ. Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. **Implant Dent**. 2002; 11(3): 235-242.
14. Dioszegi M, Cannon P, Van Wart H. Vertebrate Collagenases. **Methods Enzymol**. 1995; 248: 413-449.
15. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. **J Periodontol**. 1998; 69: 899-910.
16. Dunleavey L, Beyzade S, Ye S. Rapid genotype analysis of the matrix metalloproteinase-1 gene 1G/2G polymorphism that is associated with risk of cancer. **Matrix Biol**. 2000; 19: 175-177.
17. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, Linden U, Lundqvist S, Rundcrantz T, Johansson LA, Nilner K, Billstrom C. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. **Clin Oral Implants Res**. 2001; 12: 462-467.
18. Emonard H, Grimaud J-A. Matrix Metalloproteinases. **Cell Molec Biol**. 1990; 36: 131-153.
19. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. **Eur J Oral Sci**. 1998; 106: 721-764.
20. Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Lekholm U. Histopathologic observations on early oral implant failures. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14: 798-810.
21. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. **Biochem J**. 1996; 315: 335-342.
22. 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.
23. Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with

rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. **Lab Invest.** 1998; 78: 755-762.

24. Gorman LM, Lambert PM, Morris HF, Ochi S, Winkler S. The effect of smoking on implant survival at second-stage surgery: DICRG Interim Report N° 5. Dental Implant Clinical Research Group. **Implant Dent.** 1994; 78: 755-762.

25. Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. **J Am Dent Assoc.** 20002; 133: 452-459.

26. Gross J, Nagai Y. Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1962; 54: 1197-1203.

27. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. **J Biomed Mater Res.** 1996; 31: 19-26.

28. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. **J Biol Chem.** 1986; 261(6): 2814-2818.

29. Hollá LI, Juradja M, Fassmann A, Dvorakova N, Znojil V, Vacha J. Genetics variations in the matrix metalloproteinase-1 promoter and risk of susceptibility and/or severity of chronic periodontitis in the Czech population. **J Clin Periodontol.** 2004; 31 (8):685-90.

30. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. **J Biol Chem.** 1997; 272: 22053-22058.

31. Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, 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: 33-42.

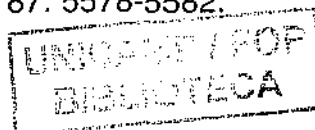
32. Ingman T, Kononen M, Konttinen YT, Siirila HS, Suomalainen K, Sorsa T. Collagenase, gelatinase and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implants and natural teeth. **J Clin Periodontol.** 1994; 21: 301-307.

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

34. Jurajda M, Muzik J, Izakovicova Holla L, Vacha J. A newly identified single nucleotide polymorphism in the promoter of the matrix metalloproteinase-1 gene. **Mol Cell Probes**. 2002; 16: 63-6.
35. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sandy JR. Matrix turnover. **J Orthod**. 2000; 27(3): 227-33.
36. Knauper V, Osthues A, DeClerck YA, Langley KE, Blaser J, Tschesche H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. **Biochem J**. 1993; 291: 847-854.
37. Kondapaka SB, Fridman R, Reddy KB. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. **Int J Cancer**. 1997; 70: 722-726.
38. Kronstrom 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): 875-822.
39. Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Branemark PI, Eriksson B, Rockler B, Lindvall AM, Yoneyama T. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 1986; 15: 53-61.
40. Lekholm U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Linden U, Bergstrom C, van Steenberghe D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1999; 14: 639-645.
41. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10 years follow-up study. **J Dent Res**. 1997; 76:1667-1674.
42. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **J Biol Chem**. 1990; 265: 17238-17245.
43. Maniatis A, Tsakanikas S, Stamatellou M, Papanastasiou K. Intermediate-dose melphalan for refractory myeloma. **Blood**. 1989; 74(3): 1177.
44. Mourant AE, Tills D, Domaniewska-Sobczack K. Sunshine and the geographical distribution of alleles of the Gc system plasma proteins. **Hum Genet**. 1976; 33(3): 307-14.

45. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest.** 1995; 72: 311-322.
46. 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: 426-430.
47. Pinto AVS, Miyagusko JM, Ramalho AS, Wassall, T, Pereira LAV. Fatores de risco, complicações e fracassos na terapêutica com implantes osseointegrados. In: Feller, Christa; Gorab, Riad. **Atualização na clínica odontológica: módulos de atualização.** ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p.133-216.
48. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. **Endocr Res.** 1997; 17: 308-332.
49. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. **Cancer Res.** 1998; 58: 5321-5325.
50. 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.
51. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, Kiyono H, Smith FW, Beck JD, Offenbacher S. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. **J Periodontal Res.** 1998; 33: 212-225.
52. 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.
53. Santos MCLG, Campos MIG, Souza AP, *et al.* Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2004, 19 (1): 38-43.
54. Schwartz Z, Kieswetter K, Dean DD, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. **J Periodontal Res.** 1997; 32: 166-171.

55. Schon R, Ohno K, Kudo M, Michi K. Peri-implant tissue reaction in bone irradiated the fifth day after implantation in rabbits: histologic and histomorphometric measurements. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1996; 11(2): 228-238.
56. Seymour GJ, Gemmell E, Lenz LJ, Henry P, Bower R, Yamazaki K. Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1989; 4: 191-198.
57. Shernoff AF, Colwell JÁ, Bingham SF. Implants for type II diabetic patients: interim report. VA Implants in Diabetes Study Group. **Implant Dent**. 1994; 3(3): 183-185.
58. Souza AP, Gerlach RF, Line SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dent Mater**. 2000; 16(2): 103-108.
59. Souza AP, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito Jr. RB, Line SRP. MMP1 Promoter Polymorphism: Association With Chronic Periodontitis Severity In A Brazilian Population. **J Clin Periodontol**. 2003; 30: 154-158.
60. Souza SJ, *et al*. Regulation of extracellular matrix-degrading proteases. **Ciência e Cultura**. 1993; 45: 313-318.
61. Stanford CM. Biomechanical and function behavior of implants. **Adv Dent Res**. 1999; 13: 88-92.
62. Stricklin GP, Jeffrey JJ, Roswit WT, Eisen AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. **Biochemistry**. 1983; 22: 61-68.
63. Teronen O, Konttinen YT, Lindqvist C, Salo T, Ingman T, Lauhio A, Ding Y, Santavirta S, Sorsa T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. **J Dent Res**. 1997; 76: 1529-1537.
64. Thompson, MW; Mcinnes, RR; Willard, HF; Thompson & Thompson: **Genetics in Medicine**. 5. ed. Pensilvania: Philadelphia, 1991. 500p.
65. Tonetti MS. Risk factors for osseodisintegration. **Periodontol** 2000. 1998; 17: 55-62.
66. 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: 32-38.
67. Van Wart He, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc Natl Acad Sci**. 1990; 87: 5578-5582.



68. Vijaykumar Mb, *et al.* Immunofluorescence quantitation of stromelysin in human synovial fibroblasts by confocal laser scanning microscopy. **Lab Invest.** 1995; 72: 484-490.
69. Weeks Jg, Halme J, Woessner Jfjr. Extraction of collagenase from the involuting rat uterus. **Biochem Biophys Acta.** 1976; 445: 205-214.
70. Weyant RJ & Burt BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. **J Dent Res.** 1993; 72: 2-8.
71. Wilson TG Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. **J Periodotol.** 1999; 70: 724-729.

