

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Departamento de Odontologia

**Impacto do Polimorfismo do Gene VEGF
na Perda de Implantes**

GLÁUCIA LACERDA SANTOS

Belo Horizonte
2010

Gláucia Lacerda Santos

Impacto do Polimorfismo do Gene VEGF na Perda de Implantes

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
Co-orientador: Prof. Dr. Élton Gonçalves Zenóbio

**Belo Horizonte
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S237p	<p>Santos, Gláucia Lacerda Impacto do polimorfismo do gene VEGF na perda de implantes / Gláucia Lacerda Santos. Belo Horizonte, 2010. 49f. : il.</p> <p>Orientador: Rodrigo Villamarim Soares Co-Orientador: Élton Gonçalves Zenóbio Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.</p> <p>1. Implantes dentários. 2. Osseointegração. 3. Fatores de crescimento do endotélio vascular .4. Polimorfismo (Genética). I. Soares, Rodrigo Villamarim. II. Zenóbio, Élton Gonçalves. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314-089.843</p>
-------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho à minha filha
Mariana, pelo apoio, compreensão e amor incondicional.

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me conduzido nesta jornada.

Ao meu orientador Rodrigo Villamarim Soares por sua seriedade e competência.

Ao meu co-orientador Elton Gonçalvel Zenóbio pelo estímulo constante e empenho em ajudar na realização desta pesquisa.

Ao professor Paulo Eduardo Alencar de Souza por sua dedicação na realização deste trabalho.

À minha querida amiga Luzia. Seu apoio foi fundamental.

Aos meus colegas do mestrado, Alessandro, Antônio, Gabriel, Glácio, Paulo e Thais pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis.

Às colegas do laboratório Karine, Marina e Milena pelo apoio constante no desenvolvimento deste trabalho.

À minha secretária Marlúcia, simplesmente por tudo.

Ao meu irmão Laércio, por sempre ter acreditado em mim.

À minha mãe, exemplo de integridade, caráter, justiça e amor em todos os momentos de minha vida.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho refere-se à dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissionalizante da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais e representa requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Implantodontia. De acordo os requerimentos do Programa para a obtenção do título de Mestre em Implantodontia, a dissertação deve conter dois artigos e estes são:

- 1) Análise do papel de polimorfismos genéticos da interleucina-1 nas periodontites e periimplantites.
- 2) Análise do impacto do polimorfismo do gene VEGF na perda de implantes.

O tema abordado apresenta relevância uma vez que estudos têm evidenciado a influência de polimorfismos genéticos na natureza, intensidade da resposta inflamatória e relação com a suscetibilidade e gravidade clínica de várias doenças, dentre as quais estão as periodontites e as periimplantites.

O primeiro artigo é uma revisão de literatura sobre a influência do polimorfismo genético da IL-1 nas periodontites e periimplantites. Esta citocina exerce importante papel na regulação da resposta inflamatória aguda e alguns indivíduos apresentam produção diferenciada da mesma. Estas variações têm sido associadas com uma resposta inflamatória alterada. Particularmente, altos níveis de IL-1 têm sido encontrados no fluido crevicular gengival de sítios com periodontites e periimplantites, quando comparados com sítios clinicamente saudáveis. Estudos diversos que identificaram a ocorrência de polimorfismos genéticos na IL-1 e avaliaram seu papel no desenvolvimento periodontites e periimplantites, serão descritos na presente revisão.

O VEGF é um importante indutor da angiogênese que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, além de atuar como mediador pró-inflamatório. No segundo artigo, amostras de células da mucosa bucal de pacientes do Departamento de Odontologia da PUC Minas foram utilizadas em experimentos laboratoriais. Os resultados da distribuição do polimorfismo genético do gene VEGF nesta população e sua relação com a falha de implantes serão descritos.

Resumo

Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas por estudos longitudinais sobre implantes de titânio utilizados na odontologia, falhas que levam a perda dos mesmos são descritas na literatura. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um indutor da angiogênese que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, além de ser um mediador pró-inflamatório. A expressão do VEGF é reduzida em indivíduos com periimplantite e existem relatos da associação entre polimorfismos no gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível impacto do polimorfismo 936C/T do VEGF na perda de implantes. Células da mucosa bucal foram coletadas de indivíduos que receberam implantes, o DNA das mesmas foi extraído e utilizado em PCRs. A análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase submetidos à digestão por meio da enzima de restrição Hin1III revelou a ausência de diferença na distribuição de variantes polimórficas do gene VEGF 936 C/T nos grupos teste e controle ($p > 0,05$; Teste Exato de Fisher). Portanto, os resultados do presente estudo indicam que este polimorfismo não interfere na ocorrência de falhas em implantes de titânio utilizados para reabilitar pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos. Estudos adicionais envolvendo amostras maiores e investigando outros polimorfismos deste ou de outros genes devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos na perda de implantes.

Palavras chave: Falha de implantes. Osseointegração. VEGF. Polimorfismos genéticos.

Abstract

Despite the high rates of success showed in longitudinal studies investigating the use of titanium implants in dentistry, the occurrence of failures is described in the literature. Implant loss could be derived from distinct factors including genetic polymorphisms. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic inducer that participates of diverse physiological and pathological processes besides been a proinflammatory mediator. VEGF expression is reduced in individuals with periimplantitis and there are reports of the association between VEGF polymorphisms and the risk of development of diseases in which inflammatory and angiogenic mechanisms are involved in the pathogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of VEGF 936C/T polymorphism in implant failure. Oral mucosal cells were collected from individuals that received implants, the DNA extracted and used in PCR reactions. The analysis of PCR products submitted to digestion by the restriction enzyme Hin1III revealed the absence of differences regarding VEGF 936 C/T frequency distribution between groups ($p>0,05$; Fishers exact test). The results from the present study indicate that this polymorphism does not interfere in the occurrence of failure of titanium implants used to rehabilitate individuals that are partially or totally edentulous. Additional studies with larger sample size and investigating other genetic polymorphisms of this or of other genes should be conducted to enhance the comprehension of polymorphisms role in implants failure.

Keywords: Implant failure. Osseointegration. VEGF. Genetic polymorphisms.

LISTA DE ARTIGOS

Esta dissertação gerou as seguintes propostas de artigos:

1- SANTOS,G.L.; SOUZA, P.E.A.; ZENÓBIO, E.G.Z.; SOARES, R.V. Análise do papel de polimorfismos genéticos da interleucina-1 nas periodontites e periimplantites. Revisão de literatura

2-SANTOS,G.L.; SOUZA, P.E.A.; ZENÓBIO,E.G.Z.; SOARES, R.V. Impacto do polimorfismo do gene VEGF na perda de implantes.

Os artigos serão submetidos à Revista Implant News e, portanto, foram elaborados de acordo com as normas da mesma.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Caracterização da amostra.....	41
TABELA 2	Prevalência do polimorfismo do VEGF (936C/T) em pacientes com e sem perda de implante	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
REFERÊNCIAS.....	15
ANEXO 1 - ARTIGO 1.....	17
ANEXO 2 - ARTIGO 2.....	34
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO.....	49

1 INTRODUÇÃO

As evidências clínicas de uma osseointegração efetiva revolucionaram a implantodontia e desta forma, a substituição de um dente natural perdido por um implante tornou-se uma alternativa viável para o tratamento de diferentes situações de edentulismo. Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas por estudos longitudinais, existe um inevitável risco de falha (ADELL et al., 1990; LEKHOLML et al., 1999). A perda do implante pode ser precoce, quando a osseointegração não ocorre, ou tardia, quando a osseointegração obtida é perdida depois de um período de função (ESPOSITO et al., 1998). Um modo de discriminar entre perda precoce e tardia é incluir as falhas que ocorreram antes da colocação da prótese no grupo precoce e aquelas que ocorreram depois da carga funcional no grupo tardio, desde que os implantes não tenham sido submetidos à carga imediata (SANTOS et al., 2004).

A perda do implante pode ser decorrente de fatores biológicos, microbiológicos e biomecânicos, mas as causas e mecanismos da falha precoce dos implantes ainda são obscuras. O fenômeno agrupado, de múltiplos implantes falharem no mesmo paciente, suporta evidências de que características individuais tais como fatores genéticos, podem causar distúrbios no processo de osseointegração e exercer um importante papel na falha destes implantes (LEITE et al. 2008). Entretanto, pouco é conhecido sobre a influência da suscetibilidade genética na osseointegração.

Neste contexto, o conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismos genéticos associados a várias doenças tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das mesmas (KINANE; HART, 2003). Alguns polimorfismos genéticos alteram a expressão e a função de genes, causando efeitos no fenótipo do indivíduo e conferindo assim, suscetibilidade a doenças (GREINTEIN; HART, 2002). Especificamente, diferentes formas de genes, variações alélicas, podem produzir variações na estrutura dos tecidos, na resposta imune adaptativa e na expressão de mediadores inflamatórios. Enquanto o efeito de algumas variações alélicas pode ter significado clínico, o de outras é provavelmente menor ou sem significância (KINANE; HART, 2003).

Alguns polimorfismos têm sido associados ao aumento da transcrição e expressão de citocinas, e particularmente, a um maior risco de desenvolver periodontites e periimplantites. Há relatos da associação entre variantes polimórficas da interleucina-1 (IL-1) (KORNMAN et al, 1997; DUFF, 2006), e da interleucina-6 (NIKOLOPOULOS et al., 2008) a um aumento da incidência da doença periodontal. Resultado similar foi observado em estudo que avaliou o polimorfismo genético de receptores para a Vitamina-D (TACHI et al., 2003). Outro estudo

(LAINE et al., 2006) revelou que o polimorfismo do gene IL-1 está associado com as periimplantites e pode representar um fator de risco para esta doença. Alguns autores (ABOYOUSSEF et al., 1998) mostraram que implantes que exibiam periimplantite continham elevados níveis da citocina IL-1 β no fluido sulcular periimplantar. Adicionalmente, o polimorfismo da MMP-1 (LEITE et al., 2008) foi associado à perda de implantes.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos mais potentes indutores da angiogênese e participa de diversos processos fisiológicos e patológicos. É capaz de aumentar potencialmente a permeabilidade microvascular, estimular a proliferação de células endoteliais, induzir a expressão de enzimas proteolíticas e migração de células endoteliais, monócitos e osteoblastos que são essenciais na angiogênese (JOHNSON et al. 1999; GUNERI et al. 2004.). Além de estimular a angiogênese, o VEGF atua também como mediador pró-inflamatório (FFERRA et al., 1992). Um estudo relatou que a expressão do VEGF em amostras de tecidos de indivíduos com periimplantite era inferior a de indivíduos sem a doença (CORNELINI et al., 2001). Diversos estudos têm avaliado a existência de associação entre polimorfismos no gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese (YOUNG et al., 2004; CHAE et al., 2008; NARS et al., 2008; CHURCHILL et al., 2008).

O gene VEGF produz diferentes isoformas protéicas com subunidades polipeptídicas possuindo diferente número de aminoácidos. Este gene está localizado no cromossoma 6p21.3 e pelo menos 30 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados a este gene foram descritos (SHIM et al. 2007). Estes polimorfismos funcionais podem resultar em transcrição alterada de sítios de fatores de reconhecimento, os quais podem afetar a atividade de transcrição e alterar os níveis da produção do VEGF.

Portanto, há fortes evidências de que as ações do VEGF no endotélio vascular são complexas e de forma nenhuma limitadas à indução de crescimento. Este indutor da angiogênese atua em processos fisiológicos e patológicos, e além de ser um mediador pró-inflamatório, possui uma expressão diferenciada em indivíduos com periimplantite e exhibe polimorfismo genético associado ao risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças. Este estudo é o primeiro a investigar a possível correlação entre o polimorfismo do gene VEGF e a perda de implantes. Assim sendo, a condução do presente estudo contribuirá para aumentar a compreensão da participação desta molécula na osseointegração e manutenção dos implantes de titânio.

2 OBJETIVOS

Realizar uma revisão da literatura sobre a influência do polimorfismo genético da interleucina-1 nas periodontites e periimplantites.

Analisar o possível impacto da participação do polimorfismo no gene do VEGF em pacientes que perderam implantes de titânio.

REFERÊNCIAS

- ADELL, R. et al. A long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **The International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.5, p.347-359, 1990.
- LEKHOLM, U. et al. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. **The International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.14, p.639-645, 1999.
- ESPOSITO, M.; HIRSCH, J.M.; LEKHOLM, U. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (1). Success criteria and epidemiology. **European Journal of Oral Sciences**, v.106, p.527-551, 1998.
- SANTOS, M.C.L.G. et al. Analysis of the transforming growth factor- β 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. **Implant Dentistry**, v.13, p.262-269, 2004.
- LEITE, M.F. et al. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). **The International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.23, p.653-658, 2008.
- KINANE, D.F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, p.430-449, 2003.
- GREENSTEIN, G.; HART, T.C. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.73, p.231-247, 2002.
- KORNMAN, K.S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.24, p.72-77, 1997.
- DUFF, G.W. Evidence for genetic variation as a factor in maintaining health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83(suppl), p.431S-5S, 2006.
- NIKOLOPOULOS, G.K. et al. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. **Journal of Clinical Periodontology**, v.35, p.754-767, 2008.
- TACHI, Y. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. **Life Sciences**, v.73, p.3313-3321, 2003.
- LAINE, M.L. et al. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. **Clinical Oral Implant Research**, v.17, p.380-385, 2006.
- ABOYOUSSEF, H. et al. Detection of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. **The International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.13, p.689-696, 1998.

GUNERI, P. et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. **Journal of Periodontology**, v.75, p.91-97, 2004.

JOHNSON, R.B.; SERIO, F.G.; DAI, X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.70, p.848-852, 1999.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Reviews**, v.13, p.18-32, 1992.

CORNELINI, R. et al. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. **The International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v.16, p.389-393, 2001.

YOUNG, H.S. et al. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. **Journal of Investigative Dermatology**, v.122, p.209-215, 2004.

CHAE, Y.S. et al. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. **Journal of Korean Medical Science**, v.23, p.421-427, 2008.

NARS, H.B. et al. Functional vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. **Clinica Chimica Acta**, v.395, p.124-129, 2008.

CHURCHILL, A.J. et al. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.49, p.3611-3616, 2008.

SHIM, J.Y. et al. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean Women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.197, p.271.e1-271.e4, 2007.

ARTIGO 1

Título

Análise do papel de polimorfismos genéticos da interleucina-1 nas periodontites e periimplantites.

Autores:

Gláucia Lacerda Santos*, Paulo Eduardo Alencar de Souza**,
Elton Gonçalves Zenóbio***, Rodrigo Villamarim Soares****

Titulação:

* Mestranda em Implantodontia pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Especialista em Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares pelo COP- PUC Minas

**Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

***Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; Coordenador do Mestrado em Implantodontia da PUC Minas

****Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais e Coordenador do Mestrado em Periodontia da PUC Minas

Resumo

A variabilidade genética pode influenciar a natureza e intensidade da resposta inflamatória tornando alguns indivíduos mais susceptíveis a determinadas doenças. As periodontites e periimplantites são infecções que têm nas bactérias o fator causal primário para seu desenvolvimento. O sistema imune do hospedeiro reage ao desafio microbiano através da produção de mediadores inflamatórios. A interleucina-1 (IL-1) é um dos principais mediadores da resposta inflamatória relacionada aos processos de reabsorção óssea e destruição de matriz extracelular. Altos níveis de IL-1 têm sido encontrados no fluido crevicular gengival de sítios com periodontite e, adicionalmente, têm sido correlacionados à quantidade de perda óssea nos mesmos. Variações polimórficas detectadas nesta citocina têm sido associadas com um efeito diferencial sobre a resposta inflamatória causando, em alguns indivíduos, uma resposta inflamatória mais exacerbada ou prolongada. O objetivo do presente estudo foi fazer uma revisão da literatura sobre a influência do polimorfismo genético da IL-1 na resposta do hospedeiro relacionada à periodontite e periimplantite. Os resultados dos estudos revisados são controversos tendo em vista que nem todos encontram relacionamento entre genótipos polimórficos da IL-1 com estas doenças bucais. Portanto, a condução de estudos adicionais em amostras mais representativas de populações, assim como de outros avaliando o possível papel de diferentes polimorfismos genéticos em aspectos qualitativos e quantitativos da inflamação periodontal e periimplantar é importante.

Unitermos - Interleucina-1; Inflamação; Polimorfismo genético; Periodontites; Periimplantites.

Título em inglês**Analysis of the role genetic polymorphism of interleukin-1 in periodontitis and periimplantitis****Abstract**

Genetic polymorphisms can influence the nature and intensity of inflammatory responses making some individuals susceptible to specific diseases. Periodontitis and periimplantitis are infections that have bacteria as the primary factor to initiate the disease. The host immune system react to microbial challenge producing inflammatory mediators. Interleukin-1 (IL-1) is an important mediator of the inflammatory response related to bone resorption as well as to the destruction of the extracellular matrix. High levels of IL-1 have been observed in gingival crevicular fluid from sites with periodontitis and additionally, have been correlated to the amount of bone loss at these sites. Polymorphic variants of this cytokine have been associated with a differential effect on the inflammatory response leading to an exacerbated and prolonged inflammatory response in some individuals. The aim of the present study was to conduct a review of the literature regarding the influence of IL-1 genetic polymorphism on host inflammatory response in periodontitis and periimplantitis. There is controversy regarding the results from the selected studies since some did not encounter a correlation between IL-1 genetic polymorphism and these oral diseases. Therefore, additional studies with larger sample size as well as evaluating the role of different genetic polymorphisms regarding qualitative and quantitative aspects of the inflammation in periodontitis and periimplantitis should be conducted.

KeyWords - Interleukin-1; Inflammation; Genetic polymorphisms; Periodontitis; Periimplantitis.

Introdução

Existem poucas oportunidades ou possibilidades para a prevenção de muitas doenças. No entanto, isto seria de grande valia para uma prática odontológica moderna. Um melhor entendimento das bases genéticas de doenças multifatoriais e das interações entre genes e ambiente, pode, em princípio, permitir a prevenção das doenças e realizar intervenções positivas considerando a suscetibilidade individual, antes que danos irreparáveis ocorram nos órgãos e tecidos¹. Deste modo, talvez em um nível individual, seja possível estabelecer um enfoque racional para a prevenção de doenças no futuro.

As doenças periodontais e periimplantares são infecções que têm microorganismos como o fator causal primário para o seu desenvolvimento. Entretanto, a extensão e a gravidade destas lesões podem ser influenciadas por fatores ambientais e predisposição genética os quais, por sua vez, podem modular a resposta inflamatória do hospedeiro².

As interleucinas são proteínas lipossolúveis secretadas principalmente por macrófagos, e estas atuam como importantes mediadores do sistema imunológico. Particularmente, a interleucina-1 (IL-1) é capaz de exercer um importante papel na regulação da resposta inflamatória aguda, atuando no processo de reabsorção óssea e destruição de matriz extracelular. Qualquer desequilíbrio na produção desta proteína, ou na expressão de seus receptores, pode contribuir para várias desordens patológicas³.

Como a variabilidade genética pode afetar a atividade de determinados genes das interleucinas ela pode, portanto, produzir indivíduos com uma resposta inflamatória mais exacerbada e/ou prolongada. Tais indivíduos podem ser mais susceptíveis a doenças inflamatórias dentre as quais são citadas as periodontites e as periimplantites. Evidências têm mostrado que, a variabilidade genética no processo inflamatório, de fato influencia a suscetibilidade e a gravidade clínica destas doenças^{1,4}.

Polimorfismos genéticos são mecanismos através dos quais um indivíduo pode exibir variações genéticas dentro de uma extensão considerada biologicamente normal. Os genes da IL-1 apresentam variantes alélicas e estas têm sido fortemente associadas a várias doenças inflamatórias e complicações de doenças infecciosas⁵. Estudos têm indicado níveis elevados de IL-1 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontites e periimplantites, quando comparados a sua expressão em sítios saudáveis⁶⁻⁷⁻⁸. O polimorfismo genético dessa citocina pode influenciar o processo de osseointegração através do efeito cumulativo de múltiplos polimorfismos².

A identificação de fatores de risco pode levar a uma substancial melhora na qualidade de vida de determinados pacientes. Portanto, tendo em vista que as manifestações clínicas, microbiológicas e histológicas associadas a dentes e implantes apresentam muitas similaridades, é relevante avaliar o papel do polimorfismo da IL-1 e sua relação com as periodontites e periimplantites¹⁰.

Revisão da Literatura

Interleucinas

As Interleucinas são proteínas lipossolúveis secretadas por macrófagos, linfócitos T e por outros tipos de célula. São importantes mediadores do sistema imunológico que permitem a comunicação entre as células. Sua atuação ocorre em conjunto com uma série de receptores e inibidores específicos para regular a resposta imune humana³.

Qualquer desequilíbrio na produção de interleucinas, ou na expressão de seus receptores, pode contribuir para várias desordens patológicas. As interleucinas são proteínas capazes de iniciar e regular a resposta imune inata, e também influenciar o resultado e a natureza da resposta imune adaptativa. São utilizadas pelo sistema imune para induzir uma resposta inflamatória através do influxo de anticorpos e linfócitos efetores aos locais da infecção. Após o contato com o antígeno, células expressam interleucinas que modulam vários mecanismos para eliminar microrganismos patogênicos. Por exemplo, células do sistema imune migram para o sítio da infecção, substâncias reativas ao oxigênio são produzidas para ajudar no combate de microrganismos fagocitados, e atividades que favorecem a coagregação são iniciadas para impedir que a infecção se espalhe. Ao mesmo tempo, interleucinas auxiliam as células dendríticas no processo de apresentação de antígenos, o que resulta em geração de linfócitos T citotóxicos. Um grande número de interleucinas produzidas durante uma infecção também participa do processo de recuperação ou reparo⁵.

As interleucinas regulam a amplitude e duração das respostas imuno-inflamatórias e estas são produzidas de maneira transitória, fortemente regulada pela presença de antígenos. As interleucinas podem ser pleiotrópicas, ou seja, um determinado tipo de interleucina pode atuar sobre vários tipos celulares. Adicionalmente possuem a propriedade de redundância, onde uma função similar pode ser estimulada por citocinas diferentes. A propriedade

multifuncional refere-se ao fato de um mesmo tipo de interleucina ser capaz de modular funções imunes distintas⁵.

Interleucina 1

A interleucina-1 (IL-1), uma citocina produzida por diversos tipos de células nucleadas, é capaz de exercer um importante papel na regulação da resposta inflamatória aguda. Após ser secretada, desencadeia vários efeitos locais e sistêmicos como ativar o endotélio vascular, ativar os linfócitos, promover a destruição local de tecido e aumentar o acesso de células efetoras. As principais células-alvo são os macrófagos e neutrófilos que induzem o aumento de produção de IL-1, osteoclastos que promovem a reabsorção óssea, e fibroblastos que secretam a colagenase e matriz de metaloproteinases relacionadas à destruição de matriz extracelular¹⁻².

Um importante efeito sistêmico desta citocina é sua ação sobre o hipotálamo, onde altera a regulação da temperatura corporal. Neste contexto atua sobre as células musculares e adiposas mobilizando energia para aumentar a temperatura corporal. A IL-1 também é capaz de induzir a expressão de proteínas da fase aguda da inflamação no fígado, as quais atuam como opsoninas para os patógenos. Outra importante função da IL-1 é a indução de leucocitose (aumento dos neutrófilos circulantes). Desta forma, a IL-1 contribui para o controle da infecção, enquanto a resposta imune adaptativa é montada².

A atividade da IL-1 é mediada por receptores específicos presentes em membranas de células alvo. Estes receptores são membros de uma grande família, e muitos estão envolvidos nos mecanismos de defesa do hospedeiro, promovendo o início da sinalização celular. A coordenação da regulação positiva e negativa destes receptores proporciona a modulação apropriada das respostas inata e inflamatória e evita o risco de transtornos patológicos¹.

Além de exercer um importante papel na regulação da resposta inflamatória aguda, esta citocina interfere na extensão das doenças inflamatórias e auto-imunes. Embora pelo menos 10 membros da família IL-1 sejam conhecidos, três componentes principais têm sido estudados: os agonistas pró-inflamatórios IL-1 α e IL-1 β (codificados pelos genes IL-1A e IL-1B, respectivamente) e a proteína antiinflamatória receptora antagonista da IL-1 (IL-1Ra, codificada pelo gene IL-1RN). Embora IL-1 β seja abundantemente expressada durante os passos iniciais da resposta de defesa, IL-1 α é um dos principais efetores da inflamação. Na homeostase normal, a ação da IL-1 é mantida pelo equilíbrio dos IL-1Ra e outros inibidores naturais. Entretanto, uma variedade de doenças, incluindo as periodontites, doenças

autoimunes, infecções, traumas, diabetes e asma estão associadas com a produção aumentada de IL-1^{1,3}.

Estudos da família de receptores das interleucinas e de seus mecanismos de defesa são relativamente novos. A função destes está associada, nos vertebrados superiores, ao aparecimento de uma resposta imune adaptativa potente e altamente específica, envolvendo imunoglobulinas, a qual transpõe a resposta imediata inata inespecífica².

Variações nas taxas de produção de IL-1 entre indivíduos têm sido observadas, assim como um grande aumento na resposta individual à infecções ou outros estímulos pró-inflamatórios. A produção diferenciada de IL-1 pode estar relacionada a polimorfismos genéticos capazes de regular a transcrição desta citocina¹.

Variações sequenciais no DNA regulador de genes que codificam importantes membros da família da IL-1 são associadas com um efeito diferencial sobre a resposta inflamatória. Isto por sua vez, altera o risco para o desenvolvimento de doenças nas quais a inflamação exerce seu papel¹.

Os genes da IL-1 podem apresentar variantes alélicas e estas têm sido fortemente associadas a várias doenças inflamatórias e complicações de doenças infecciosas⁵. Polimorfismos do gene da IL-1 são bom exemplo de como a variabilidade genética pode influenciar a manifestação e a progressão de doenças. Os três principais genes conhecidos da família da interleucina-1, IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra são polimórficos, e nítidos haplótipos podem ser identificados dentro deste grupo de genes ou através dos genes individuais. Haplótipos são grupos co-herdados de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) sobre um mesmo cromossomo. Estes haplótipos mostram diferenças funcionais em termos de transcrição (RNA mensageiro), expressão (produção de IL-1) e também em relação à modulação de outros componentes da inflamação como a proteína C-reativa¹.

Polimorfismos genéticos

Geneticistas referem-se a diferentes formas de um gene como variantes alélicas ou alelos. As variantes alélicas de um gene se diferenciam em suas sequências de nucleotídeos. Quando as alterações na sequência de nucleotídeos ocorrem raramente e não estão presentes em muitos indivíduos, isto é denominado mutação. Quando um alelo específico ocorre em pelo menos 1% da população, isso é denominado polimorfismo genético. Em contraste às mutações, polimorfismos genéticos são geralmente considerados como variantes normais na população⁴.

O termo polimorfismo genético designa as múltiplas (poly) formas (morphic) sob as quais um gene pode se apresentar. O termo polimorfismo não necessariamente denota que a variação genética seja prejudicial. Atualmente, polimorfismos de nucleotídeo único são relativamente comuns no genoma humano e ocorrem aproximadamente uma vez a cada 100 ou 300 pares de bases. A localização do polimorfismo no gene pode ser importante. Genes podem ser polimórficos devido a diferenças nas regiões codificadoras do DNA (exons) que determinam a composição específica de aminoácidos de uma proteína. Tal polimorfismo pode resultar em diferentes formas de proteínas com propriedades distintas. Genes também podem variar em decorrência de alterações polimórficas em segmentos que não codificam proteínas. Estas mudanças podem acarretar consequências funcionais ou não. Em outras situações, quando alterações ocorrem nas regiões reguladoras de um gene, elas podem influenciar como o gene pode se expressar ativamente sob certas circunstâncias, ou seja, através do nível de transcrição do gene, splicing do RNAm ou estabilização do RNAm. Os tipos específicos de polimorfismos analisados (polimorfismo de nucleotídeo único, minisatélites e número variável de “tandem repeats”) são frequentemente escolhidos porque têm sido associados com variações de produção de proteínas “*in vivo*” ou “*in vitro*”, ou a proteína por si mesma está associada a etiopatogênese da doença^{2,11}.

Polimorfismo genético da IL-1 nas periodontites

O conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismo genético de várias doenças imunes e inflamatórias, tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das doenças, incluindo as periodontites⁴.

As bactérias são o fator causal primário para o desenvolvimento da periodontite, mas a extensão e a gravidade da lesão periodontal podem ser influenciadas por fatores ambientais e predisposição genética². As doenças periodontais têm início com o acúmulo do biofilme na região do sulco gengival e este induz a uma resposta inflamatória. Esta inflamação, gengivite crônica, pode progredir, em certos indivíduos suscetíveis, para uma condição inflamatória destrutiva crônica denominada periodontite. Embora a gengivite seja um processo reversível, na periodontite, osso e outros tecidos de suporte são destruídos¹⁸.

Estudos de polimorfismos genéticos associados às doenças periodontais apontam para a importância de se identificar as variações alélicas dos genes que podem ser usadas para avaliar o potencial de risco para estas doenças⁴. Estudos realizados em humanos e animais mostram a influência da IL-1 na resposta inflamatória e imune relacionadas à periodontite⁵.

Esta citocina pró-inflamatória é considerada um dos mediadores da doença periodontal crônica. Estudos prévios têm indicado níveis elevados de IL-1 no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontites, quando comparados com sítios saudáveis⁶⁻⁷. Estes estudos analisaram o relacionamento entre genótipo e produção de IL-1 β e revelaram que genótipos específicos podem causar impacto na saúde periodontal. Foi demonstrado que, quando monócitos de indivíduos genótipo positivo para IL-1 β +3953 alelo 2 entraram em contato com endotoxinas, produziram uma quantidade maior de IL-1 β que monócitos de pacientes sem este polimorfismo.

Um estudo realizado com o objetivo de avaliar a associação entre o polimorfismo da IL-1 e inflamação gengival foi conduzido⁷. Indivíduos com genótipo negativo apresentaram taxas significativamente mais baixas de sangramento à sondagem. Os autores concluíram que o aumento e a prevalência de sangramento à sondagem, observados em pacientes com genótipo positivo, indicaram que estes apresentavam uma resposta inflamatória exacerbada determinada geneticamente e esta se expressava clinicamente nos tecidos periodontais.

Uma revisão sistemática¹⁸ foi realizada com o objetivo de investigar a associação do polimorfismo genético da IL-1 α e IL-1 β com as formas agressivas e crônicas da doença periodontal. Os resultados mostraram uma associação significativa entre variantes polimórficas da IL-1 α e IL-1 β com a doença periodontal crônica, porém nenhuma correlação com a forma agressiva foi encontrada.

Alguns estudos mostram que pacientes com genótipo positivo para o polimorfismo da IL-1 apresentam um risco mais elevado (2,7 vezes) para perdas dentárias durante terapia periodontal de suporte, e que quando o hábito de fumar é associado a este genótipo positivo, as chances de perdas dentárias após a terapia periodontal aumentam 7,7 vezes¹⁹.

Embora diversos estudos⁴⁻⁷ que investigaram o papel da IL-1 na doença periodontal verificaram associação positiva entre as variações específicas do gene da IL-1 e a gravidade da doença periodontal, a ausência de relação entre essa citocina e a progressão do processo inflamatório periodontal também foi relatada²⁰. Neste estudo, a associação entre LPS estimulando a produção de IL-1 β em pacientes adultos com periodontite genótipo positivo e genótipo negativo foi avaliada. Os autores usaram LPS de uma variedade de patógenos periodontais para estimular monócitos periféricos do sangue, e os resultados demonstraram que os monócitos de pacientes com genótipos positivos e negativos não mostraram diferenças significativas na produção de IL-1 β em resposta a qualquer LPS testado.

Evidências adicionais sobre a possível associação da produção de IL-1 β com o genótipo positivo foram descritas²¹. Estes autores realizaram um estudo “in vivo” no qual

compararam a concentração desta citocina no fluido crevicular de pacientes genótipo positivo e genótipo negativo antes, e 3 semanas depois de aplainamento radicular, em grupos de fumantes e não fumantes. Quando todos os sítios, independente da profundidade de sondagem (PS) inicial, foram avaliados conjuntamente, nenhum relacionamento entre status de genótipo e níveis de IL-1 β foi encontrado. Entretanto, quando os dados foram avaliados em relação à sítios com PS inicial menor que 4 mm, pacientes tratados e não tratados, apresentavam uma concentração maior de IL-1 β no grupo de indivíduos genótipo positivo. Quando níveis de IL-1 β de pacientes genótipo positivo e genótipo negativo foram comparados em relação à PS inicial de 4 a 6 mm ou \geq 6 mm de profundidade, diferenças significativas em pacientes tratados e não tratados não foram observadas.

O relacionamento entre o genótipo da IL-1 e os resultados clínicos de várias terapias periodontais foi avaliados²². Os autores concluíram que não existem evidências suficientes para estabelecer se o status do genótipo da IL-1 contribui ou não para progressão das periodontites e/ou resultados de tratamentos periodontais.

Os resultados de numerosos estudos sugerem que o relacionamento entre o genótipo e os níveis de IL-1 β ainda não são completamente compreendidos. Não é possível afirmar ainda que os níveis aumentados de IL-1 β estão fundamentados no polimorfismo da IL-1. Além disso, grandes variações entre pacientes com respeito aos níveis de IL-1 β sugerem que outros loci genéticos podem estar envolvidos. Ainda, considerando a regulação complexa e redundante da cascata de citocinas que ocorre na inflamação, é racional esperar que o polimorfismo de múltiplos genes possa influenciar aspectos qualitativos e quantitativos da inflamação periodontal⁴.

Polimorfismo genético da IL-1 nas periimplantites

O sucesso dos tratamentos realizados com implantes de titânio para a reabilitação de pacientes parcialmente, ou totalmente edêntulos, tem sido documentado e está diretamente relacionado com a estabilidade da osseointegração. Com o decorrer do tempo, entretanto, complicações biológicas relacionadas aos implantes podem ocorrer e levar à perda do implante²²⁻²³.

Doenças periimplantares representam um termo coletivo que designa processos inflamatórios crônicos dos tecidos moles que rodeiam um implante em função. Mucosites e periimplantites são definidas como processos inflamatórios reversíveis nos tecidos moles que rodeiam um implante, sendo as periimplantites caracterizadas por perda óssea adicional ao

redor dos implantes. Resultados de estudos clínicos e experimentais mostram que a formação de um biofilme submucoso exerce um importante papel no início e propagação da inflamação periimplantar com subsequente perda de osso marginal²⁴. Entretanto, a doença é provavelmente o resultado de vários fatores que podem influenciar a resposta inflamatória do hospedeiro, incluindo polimorfismos em genes relevantes, hábito de fumar e estresse²⁵.

A microbiota presente em implantes estáveis e em implantes fracassados relaciona-se, respectivamente, com aquela observada em sítios clinicamente saudáveis e com doença periodontal, indicando que os microorganismos patogênicos na periodontite do adulto e na periimplantite são similares. A semelhança na composição do biofilme presente nas bolsas em sítios de dentes ou implantes, assim como o predomínio de bactérias gram-negativas em ambos já foi relatada²⁶.

A citocina inflamatória IL-1 β exerce importante papel na destruição do periodonto nas periodontites e tem sido sugerido que um mecanismo patogênico similar pode ser responsável pela destruição tecidual ao redor dos implantes²³. Estudos analisando o fluido crevicular de implantes diagnosticados com periimplantite mostraram elevados níveis da citocina inflamatória²⁷. Estes resultados foram similares àqueles reportados para níveis de IL-1 β na periodontite e suportam a premissa de que os dois processos de doença se assemelham em relação à etiologia e patogênese. Os autores também reportaram que o número de leucócitos encontra-se aumentado no fluido crevicular de pacientes com implantes considerados “perdidos”. Outro estudo descreveu níveis aumentados de IL-1 β nos sítios com periimplantite em relação a sítios com mucosite e níveis ainda mais elevados em relação a sítios saudáveis⁸.

Um estudo²⁹ realizado com o objetivo de investigar o polimorfismo do grupo de genes da IL-1 em pacientes com periimplantite descreveu evidências de que o polimorfismo do gene IL-1Ra está associado com a periimplantite e pode representar um fator de risco para esta doença. Nenhuma associação entre os genótipos IL-1 α e IL-1 β , separadamente ou combinados, e a periimplantite foi encontrada. Outro estudo³⁰ também não encontrou associação entre polimorfismo genético dos genes da citocina próinflamatória IL-1 α e IL-1 β com a periimplantite. É importante ressaltar que, neste estudo o polimorfismo genético da IL-1Ra não foi avaliado.

O impacto do genótipo da IL-1 e do hábito de fumar sobre o prognóstico e desenvolvimento de complicações relacionadas aos implantes osseointegrados foram avaliados previamente¹⁴. Os resultados mostraram a existência de efeito sinérgico entre genótipo positivo e hábito de fumar com aumento significativo dos riscos de complicações biológicas para os implantes dentais nestes indivíduos.

Uma revisão sistemática, realizada com o objetivo de avaliar a associação do genótipo da IL-1 α e IL-1 β com as periimplantites em pacientes fumantes e não fumantes, relatou que não existem evidências para suportar ou refutar uma associação entre o genótipo da IL-1 e as periimplantites. De acordo com estes autores, vários polimorfismos genéticos podem ter implicação na modulação da resposta inflamatória ao desafio bacteriano ao redor de implantes osseointegrados²².

Discussão

A resposta inflamatória tecidual geralmente é bem controlada e esta deve ser compatível com o desafio microbiano. Ela deve ser capaz de erradicar o patógeno e reparar as injúrias teciduais, além de limitar o dano ao hospedeiro. A inflamação também é um importante componente da patogênese de muitas doenças crônicas. Riscos para muitas doenças não são iguais para todos os indivíduos e cada vez mais evidências têm sugerido que polimorfismos genéticos podem ser determinantes de riscos diferenciais para doenças humanas⁴. Neste contexto, uma gama de deficiências ou variações genéticas na resposta do hospedeiro pode aumentar a probabilidade para o desenvolvimento de periodontite e/ou perimplantite, desde que seja permitido o acúmulo do biofilme na região do sulco gengival ou periimplantar¹³⁻¹⁶.

Um aspecto da resposta inflamatória do hospedeiro, o sistema das citocinas interleucinas, tem atraído muita atenção como uma variação de crucial importância que pode influenciar a resposta do hospedeiro em doenças bucais. As citocinas, sinais moleculares intercelulares que coordenam a resposta inflamatória do hospedeiro à injúria, têm sido identificadas como mediadores importantes de periodontites e perimplantites¹³⁻¹⁶.

A variabilidade genética relacionada ao sistema das citocinas pode influenciar a suscetibilidade a doenças, assim como a fatores modificadores das mesmas⁴. Esta variabilidade genética pode afetar a atividade de determinados genes das interleucinas, causando, em alguns indivíduos, uma resposta inflamatória mais exacerbada ou prolongada. Portanto, indivíduos podem ser mais susceptíveis a doenças inflamatórias e relatos comprovam que, a variabilidade genética no processo inflamatório, de fato influencia a suscetibilidade e a gravidade clínica de doenças^{1,4}.

O osso é um tecido dinâmico, continuamente remodelado através de processos de reabsorção e formação óssea. A produção local de citocinas inflamatórias como a IL-1 modula estes processos, e níveis elevados desta citocina podem levar a uma perda óssea

anormal ao redor de dentes ou implantes³⁰. Altos níveis de IL-1 têm sido encontrados no fluido crevicular gengival de sítios com periimplantites e periodontites, quando comparados com sítios saudáveis²⁶.

Na periodontite, a perda óssea alveolar é causada pela formação e ativação local dos osteoclastos. A diferenciação destas células pode ser iniciada pela ação da citocina pró-inflamatória IL-1. Expressão elevada de IL-1 nos tecidos periodontais, assim como o aumento das concentrações desta citocina no fluido crevicular gengival, associam-se com a progressão da doença periodontal¹⁸. A quantidade total de IL-1 α e IL-1 β também é correlacionada com a perda óssea alveolar na periodontite. A importância da IL-1 na patogênese da periodontite foi enfatizada em modelos animais com a indução de gengivite experimental em primatas não humanos. A administração exógena do antagonista da IL-1 inibiu a perda óssea alveolar, impediu o recrutamento de células inflamatórias e a formação de osteoclastos, evitando, dessa forma, a perda de tecido periodontal¹⁷.

Uma resposta imune exacerbada pode destruir os tecidos periimplantares ao sintetizar e liberar citocinas e mediadores lipídicos que participam do processo inflamatório osteolítico²⁶. De fato, altos níveis de mediadores inflamatórios são encontrados em sítios doentes de implantes. Desde que o polimorfismo pode afetar a transcrição destes mediadores, sua análise pode identificar possíveis grupos de risco efetivo da doença ao redor dos implantes dentais².

Plasmócitos, linfócitos, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos já foram observados nos tecidos periimplantares²⁸. A IL-1 β é capaz de induzir a produção de prostaglandinas pelos macrófagos e fibroblastos nos tecidos periodontais/periimplantares. Elevados níveis de colagenase nos tecidos gengivais inflamados ao redor de dentes e mucosas periimplantares também foram observados⁹. Estes achados sugerem que um mecanismo similar envolvendo mediadores inflamatórios pode ser responsável pela patogênese das periodontites e perimplantitis²³.

Os genes da IL-1 α , IL-1 β e IL-1 Ra são potentes candidatos a marcadores genéticos nas periimplantites. A atuação da IL-1 inclui ativação das células T e B, quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos, além de estimulação da produção de outras citocinas, tais como o fator de necrose tumoral, MMPs e a prostaglandina E₂. Alguns estudos têm descrito uma associação entre IL-1Ra alelo 2 e várias doenças auto-imunes e inflamatórias, tais como colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes nefropáticas e outras¹².

Estudos prévios têm indicado que periimplantites e falhas de implantes parecem se agrupar em alguns indivíduos, e que um paciente que perdeu um implante possui elevado

risco de perder outros²⁹. Estas observações têm levantado o questionamento da existência de um denominador comum para a suscetibilidade ao desenvolvimento de periimplantites. A ocorrência de múltiplas perdas de implantes no mesmo indivíduo suporta a evidência de que características individuais exercem um importante papel na falha precoce dos implantes. No entanto, outros autores¹⁰ acreditam que a falha precoce estaria associada a respostas do tecido ósseo decorrentes do processo de colocação do implante ou outros mecanismos traumáticos que, por sua vez, não refletiriam a ligação bactéria-inflamação, ou alterações metabólicas decorrentes de aumento de IL-1. Para estes autores, o genótipo da IL-1 poderia causar maior impacto nas falhas tardias. Adicionalmente é importante ressaltar que, até a presente data, pouco é conhecido sobre a influência da suscetibilidade genética na osseointegração.

Conclusão

Os resultados dos estudos revisados sugerem que o relacionamento entre o genótipo e os níveis de IL-1 ainda não são completamente compreendidos. Não é possível afirmar que níveis aumentados de IL-1 estão fundamentados exclusivamente no polimorfismo desta citocina. Além disso, grandes variações entre pacientes em relação aos níveis de IL-1 sugerem que outros *loci* genéticos podem estar envolvidos. Considerando a regulação complexa e redundante da cascata de citocina que ocorre na inflamação, é racional supor que o polimorfismo de múltiplos genes possa influenciar aspectos qualitativos e quantitativos da inflamação periodontal e periimplantar.

Referências

1. Duff GW. Evidence for genetic variation as a factor in maintaining health. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):431S-5S.
2. Greintein G & Hart TC. A critical assesment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:231-247.
3. Tayal V & Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics- An update. *Eur J Pharmacology* 2008;579:1-12.

4. Kinane DF & Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(6):430-449.
5. Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, 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;24:72-77.
6. Pociot F & Molvig JWL. A Tac 1 polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 β) gene correlates with secretions in vitro. *Eur J Clin Invest* 1992;22:810-818.
7. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodont Res* 2000;35:102-107.
8. Murata M. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res* 2002;13(6):637-643.
9. Ericsson I, Lekholm U, Branemark P-I, Lindhe J, Glantz PO, Nyman S. A clinical evaluation of fixed bridge restorations supported by the combination of teeth and osseointegrated titanium implants. *J Clin Periodontol* 1986;13:307-312.
10. Wilson TG Jr & Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999;70:724-729.
11. Cullup H & Stark G. Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease. *Leukemia & Lymphoma* 2005;46(4):517-523.
12. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovani SF, Macdowell TL, Wilson AG et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994;106:637-642.
13. Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontology* 2000, 2003;32:36-49.
14. Gruica B, Wang H-Y, Lang NP, Buser D. impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:393-400.
15. Bullon P, Fiorini M, Goteri G, Rubini C, Battino M. Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantites condition, and aggressive periodontites. *Clin Oral Impl* 2004;15:553-559.
16. Ferreira Jr SB, Trombone APF, Repeke CE, Cardoso CR, Martins Jr W, Santos CF et al. *Infection and Immunity* 2008;76(8):3725-3734.
17. Laine ML, Farre MA, Gonzalez G, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG et al. Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res* 2001;80:1695-1699.

18. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol* 2008;35:754-767.
19. McGuire M, Nunn M. Prognosis versus actual outcome. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999;70:49-56.
20. Mark LL, Haffajee AD, Socransky SS. Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1B expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodont Res* 2000;35:172-177.
21. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1B and tumor necrosis factor α in periodontal tissue end gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999;70:567-573.
22. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Zwahlen M, Salvi GE. Association of the composite IL-1 genotype with peri-implantitis: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 2008;19:1154-1162.
23. Aboyoussef H, Carter C, Jandinski JJ, Panagakos FS. Detection of prostaglandin E₂ and matrix metalloproteinases in implant crevicular fluid. *Int J Maxillofac Implants* 1998;13:689-696.
24. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Impl Res* 1992;3:9-16.
25. Genco RJ & Loe H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 1993;2:98-116.
26. George K. Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J Periodontol* 1994;8:766-770.
27. 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;11:794-799.
28. Adell R, Lekholm U, Rockler B. Marginal tissue reactions to osseointegrated titanium fixtures. A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986;15:53-61.
29. Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansaker AM, Pena AS, Winkelhoff AJv, Winkel EG. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:380-385.
30. Campos MIG, Santos MCLG, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SRP. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent* 2005;14(4):391-396.

ARTIGO 2

Título

Impacto do Polimorfismo do Gene VEGF na Perda de Implantes

Autores

Gláucia Lacerda Santos*, Paulo Eduardo Alencar de Souza**, Élton Gonçalves Zenóbio***, Rodrigo Villamarim Soares****

Titulação

* Mestranda em Implantodontia pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Especialista em Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares pelo COP- PUC Minas

**Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

***Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; Coordenador do Mestrado em Implantodontia da PUC Minas

****Professor adjunto III da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais e Coordenador do Mestrado em Periodontia da PUC Minas

Resumo

Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas por estudos longitudinais sobre implantes de titânio utilizados na odontologia, falhas que levam à perda dos mesmos são descritas na literatura. A perda do implante pode ser decorrente de fatores diversos, incluindo entre estes os polimorfismos genéticos. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um indutor da angiogênese que participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, além de ser um mediador pró-inflamatório. A expressão do VEGF é reduzida em indivíduos com periimplantite e existem relatos da associação entre polimorfismos no gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível impacto do polimorfismo 936C/T do VEGF na perda de implantes. Células da mucosa bucal foram coletadas de indivíduos que receberam implantes, o DNA foi extraído e utilizado em PCRs. A análise dos produtos da reação em cadeia da polimerase, submetidos à digestão por meio da enzima de restrição *Hin1II*, revelou a ausência de diferença na distribuição de variantes polimórficas do gene VEGF 936 C/T nos grupos teste e controle ($p > 0,05$; Teste Exato de Fisher). Portanto, os resultados do presente estudo indicam que este polimorfismo não interfere na ocorrência de falhas em implantes de titânio utilizados para reabilitar pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos. Estudos adicionais envolvendo amostras maiores ou investigando outros polimorfismos deste ou de outros genes devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos na perda de implantes.

Unitermos - Falha de implantes; Osseointegração; VEGF; Polimorfismos genéticos.

Título em Inglês

Impact of VEGF polymorphism on implant failure

Abstract

Despite the high rates of success showed in longitudinal studies investigating the use of titanium implants in dentistry, the occurrence of failures is described in the literature. Implant loss could be derived from distinct factors including genetic polymorphisms. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic inducer that participates of diverse physiological and pathological processes besides been a proinflammatory mediator. VEGF expression is reduced in individuals with periimplantitis and there are reports of the association between VEGF polymorphisms and the risk of development of diseases in which inflammatory and angiogenic mechanisms are involved in the pathogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of VEGF 936C/T polymorphism in implant failure. Oral mucosal cells were collected from individuals that received implants, the DNA extracted and used in PCR reactions. The analysis of PCR products submitted to digestion by the restriction enzyme Hin1II revealed the absence of differences regarding VEGF 936 C/T frequency distribution between groups ($p > 0,05$; Fishers exact test). The results from the present study indicate that this polymorphism does not interfere in the occurrence of failure of titanium implants used to rehabilitate individuals that are partially or totally edentulous. Additional studies using larger sample size or investigating other genetic polymorphisms of this or of other genes should be conducted to enhance the comprehension of polymorphisms role in implants failure.

Keywords - Implant failure; Osseointegration; VEGF; Genetic polymorphisms.

Introdução

As evidências clínicas de uma osseointegração efetiva revolucionaram a implantodontia, e desta forma a substituição de um dente natural perdido por um implante tornou-se uma alternativa viável para o tratamento de diferentes situações de edentulismo. Apesar das altas taxas de sucesso apresentadas por estudos longitudinais, existe um inevitável risco de falha¹⁻². A perda do implante pode ser precoce, quando a osseointegração não ocorre, ou tardia, quando a osseointegração obtida é perdida depois de um período de função³. Um modo de discriminar entre perda precoce e tardia é incluir as falhas que ocorreram antes da colocação da prótese no grupo precoce e aquelas que ocorreram depois da carga funcional no grupo tardio, desde que os implantes não tenham sido submetidos à carga imediata⁴.

A perda do implante pode ser decorrente de fatores biológicos, microbiológicos e biomecânicos, mas as causas e mecanismos da falha precoce dos implantes ainda são obscuras. O fenômeno agrupado, de múltiplos implantes falharem no mesmo paciente, suporta evidências de que características individuais tais como fatores genéticos, podem causar distúrbios no processo de osseointegração e exercer um importante papel na falha (Leite et al 2008)⁵. Entretanto, pouco é conhecido sobre a influência da suscetibilidade genética na osseointegração.

Neste contexto, o conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismos genéticos associados a várias doenças, tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das mesmas⁶. Alguns polimorfismos alteram a expressão e a função de genes, causando efeitos no fenótipo do indivíduo e conferindo assim, suscetibilidade à doenças⁷. Especificamente, diferentes formas de genes, variações alélicas, podem produzir variações na estrutura dos tecidos, na resposta imune adaptativa e na expressão de mediadores inflamatórios. Enquanto o efeito de algumas variações alélicas pode ter significado clínico, o de outras é provavelmente menor ou sem significância⁶.

Alguns polimorfismos têm sido associados ao aumento da transcrição e expressão de citocinas, e particularmente, a um maior risco de desenvolver periodontites e periimplantites. Há relatos da associação entre variantes polimórficas da interleucina-1 (IL-1)⁸⁻⁹ e da interleucina-6¹⁰ a um aumento da incidência da doença periodontal. Resultado similar foi observado em estudo que avaliou o polimorfismo genético de receptores para a Vitamina-D¹¹. Outro estudo¹² revelou que o polimorfismo do gene IL-1 está associado com as periimplantites e pode representar um fator de risco para esta doença. Adicionalmente, foi mostrado que implantes que exibiam periimplantite continham elevados níveis da citocina IL-

1 β no fluido crevicular gengival¹³. O polimorfismo da MMP-1 também foi associado à perda de implantes⁵.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos mais potentes indutores da angiogênese e participa de diversos processos fisiológicos e patológicos. É capaz de aumentar potencialmente a permeabilidade microvascular, estimular a proliferação de células endoteliais, induzir a expressão de enzimas proteolíticas e migração de células endoteliais e monócitos que são essenciais na angiogênese¹⁴⁻¹⁵. Além de estimular a angiogênese, o VEGF atua também como mediador pró-inflamatório¹⁶. Um estudo prévio relatou que a expressão do VEGF em amostras de tecidos de indivíduos com periimplantite era inferior a de indivíduos sem a doença¹⁷. Diversos estudos têm avaliado a existência de associação entre polimorfismos no gene VEGF e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam da patogênese¹⁸⁻²¹.

O gene VEGF produz diferentes isoformas protéicas com subunidades polipeptídicas possuindo diferente número de aminoácidos. O gene VEGF está localizado no cromossoma 6p21.3 e pelo menos 30 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados a este gene foram sido descritos²². Estes polimorfismos funcionais podem resultar em transcrição alterada de sítios de fatores de reconhecimento, os quais podem afetar a atividade de transcrição e alterar os níveis da produção do VEGF.

Portanto, há fortes evidências de que as ações do VEGF no endotélio vascular são complexas e de forma nenhuma limitadas à indução de crescimento. Este indutor da angiogênese atua em processos fisiológicos e patológicos, e além de ser um mediador pró-inflamatório, possui uma expressão diferenciada em indivíduos com periimplantite e exhibe polimorfismo genético associado ao risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças. Até a presente data não existem estudos publicados analisando a possível relação entre o polimorfismo do gene VEGF e a perda de implantes, assim sendo a condução do presente contribuirá para aumentar a compreensão do papel desta molécula na osseointegração e manutenção dos implantes de titânio.

Materiais e Métodos

Caracterização da Amostra

Este estudo observacional transversal envolveu indivíduos do estado de Minas Gerais, Brasil, e o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, sob número CAAE 0016.0.213.000-05. Os critérios de exclusão e inclusão descritos abaixo foram baseados no estudo de Leite et al., 2008. As seguintes doenças/situações levaram à exclusão de possíveis participantes: imunodepressão; gravidez; diabéticos; osteoporose; HIV e quimioterapia. Foram selecionados pacientes que receberam implantes de titânio na Faculdade de Odontologia da PUC Minas seguindo o protocolo da unidade. O grupo controle possuía pacientes com 1 ou mais implantes osseointegrados, com ausência de periimplantites. O grupo teste, pacientes que perderam um ou mais implantes.

Coleta de Células da Mucosa Oral e Obtenção das Amostras de DNA

O procedimento de coleta e processamento das amostras foi baseado no estudo de Boom et al., 1990²³. Foram realizadas coletas de células epiteliais da mucosa jugal bilateralmente, através de raspagem com escova cervical estéril descartável. As cerdas das escovas foram lavadas imediatamente em microtubos contendo 1 ml de tampão de Krebbs (0,724% NaCl; 0,03% KCl; 0,028% MgSO₄; 0,594% HEPES; 0,18% C₆H₁₂O₆ em água deionizada). A extração do DNA foi feita com base em protocolo já descrito²³, com algumas modificações. Após centrifugação das células descamadas a 200g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e 20 µl de sílica (SiO₂, Sigma, St Louis, MO, USA) e 450 µl de tampão de lise (6 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6,4, 25 mM EDTA e 1,5% Triton X-100) foram adicionados aos pellets obtidos. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, incubadas a 56°C em banho seco por 30 minutos, homogeneizadas, centrifugadas novamente e o sobrenadante, descartado. Os pellets obtidos (DNA ligado à sílica) foram lavados duas vezes com 450 µl de tampão de lavagem (6 M GuSCN, 65 mM Tris-HCl pH 6,4), duas vezes com 450 µl de etanol 70% e uma vez com 450 µl de acetona. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados novamente, os sobrenadantes descartados e os pellets mantidos em banho seco a 56°C por 30 minutos. Finalmente, 100 µl de tampão Tris-EDTA foram adicionados e os tubos incubados em banho seco a 56°C, durante 12 horas. Após centrifugação, os

sobrenadantes contendo o DNA foram armazenados para utilização nas reações de amplificação gênica.

Reação em Cadeia da Polimerase - Digestão dos produtos e diagnóstico molecular

O DNA obtido, pela extração, foi utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR). As seqüências dos primers usados foram 5'-AAGGAAGAGGAGACTCTGCGCAGAGC-3' (senso) e 5'-TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTACAG -3' (anti-senso). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 8µl de DNA; 12 µl de tampão Pré-mix (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), que contém íons, desoxinucleotídeos e enzima Taq DNA polimerase; 0,5 µl de cada primer e 4µl de H₂O. Foi utilizado termociclador (Eppendorf® Mastercycler personal, Hamburg, Alemanha) com o seguinte programa de PCR para a amplificação gênica: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, mais 1 minuto a 64°C, mais 40 segundos a 72°C e um último ciclo de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram digeridos pela enzima de restrição Hin1II (Sinapse, São Paulo, SP, Brasil). De acordo com o genótipo do indivíduo, fragmentos de digestão de diferentes tamanhos (208pb; 122 pb e 86 pb) foram obtidos. Os produtos gênicos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e as bandas evidenciadas através de coloração com nitrato de prata.

Análise Estatística

A análise foi realizada utilizando-se o Teste Exato de Fisher para comparar as distribuições dos genótipos entre os grupos avaliados. Um nível de significância $\alpha= 0,05$ foi utilizado. A análise foi realizada utilizando-se o programa estatístico StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, Califórnia, USA).

Resultados

Neste estudo observacional transversal, um total de 440 fichas clínicas de pacientes que receberam 1 ou mais implantes no Departamento de Odontologia da PUC Minas foi avaliado. Pacientes com perda de implante, assim como pacientes que não exibiram perda de implantes, foram convocados para compor os grupos teste e controle respectivamente. Características relacionadas ao gênero, idade, e ao fabricante do implante utilizado nos pacientes que compareceram à unidade, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização da amostra.

		Grupo Teste (n=40)	Grupo Controle (n=27)
Gênero	Masculino	16	6
	Feminino	24	21
Idade (anos)	Faixa	26-81	23-67
	Média	49,8	51,7
Fabricante	BIOMET 3I	12	8
	CONEXÃO	1	0
	MASTER POROUS	0	1
	NEODENT	15	13
	NOBEL	2	0
	PEC LAB	1	0
	SIN	1	0
	STRAWMAN	4	0
	N/E	4	5

N/E - não especificado

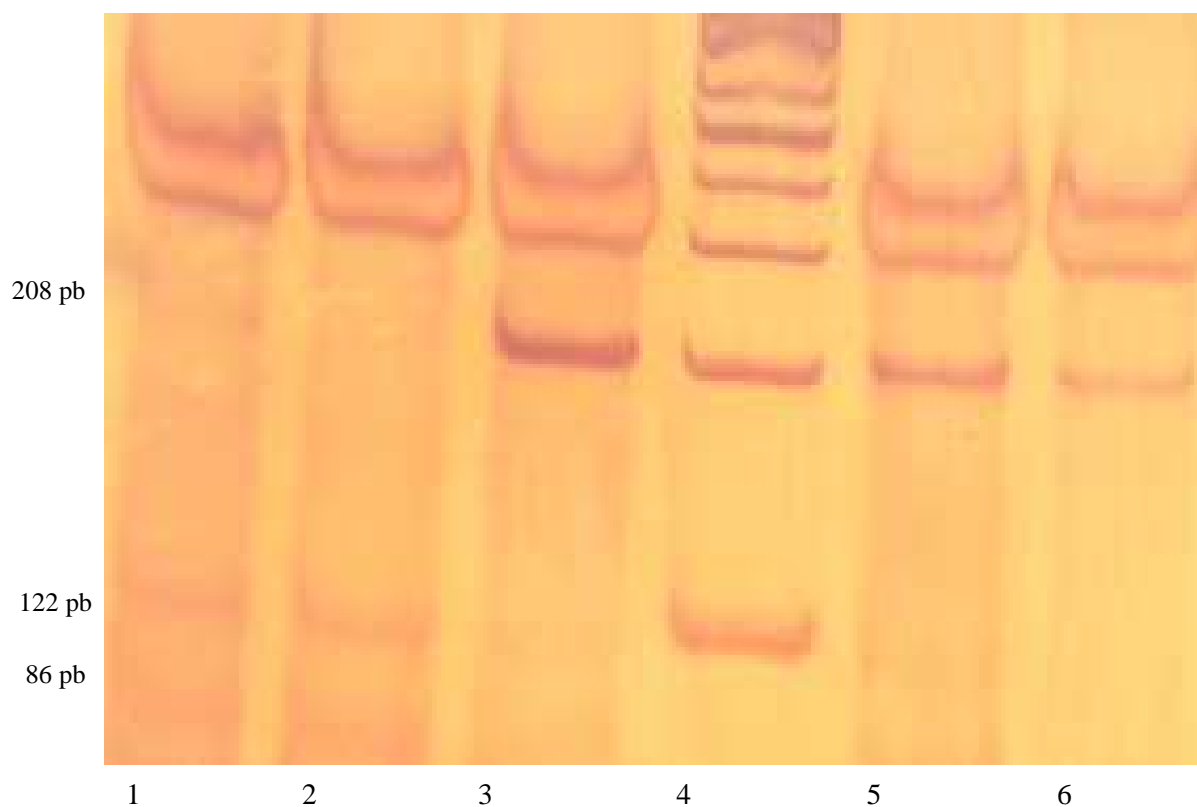
Como pode ser observado, em ambos os grupos houve um predomínio de pacientes do gênero feminino, e as médias de idade ficaram em torno de 50 anos. No grupo teste as perdas de implantes dos fabricantes BIOMET 3I e NEODENT predominaram. Entretanto, cabe ressaltar que os implantes destes fabricantes são os mais utilizados estando, portanto, mais sujeitos à ocorrência de falhas.

Amostras de DNA de 15 indivíduos do grupo teste e 10 do grupo controle foram obtidas e utilizadas em reações de PCR. A análise dos produtos amplificados e digeridos da região do gene VEGF onde se encontra o 936 C/T foi efetuada em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata e um gel representativo pode ser observado na Figura 1.

A digestão dos produtos da reação em cadeia da polimerase utilizando a enzima de restrição Hin1III permite a diferenciação de homozigotos 936 C/C, heterozigotos 936 C/T e

homozigotos 936T/T tendo em vista que os produtos de homozigotos 936 C/C não são clivados gerando uma banda com 208 pares de base, os de heterozigotos são clivados gerando uma banda com 208 pares de base, uma com 122 e outra com 86 pares de base e, finalmente, os de homozigotos 936T/T geram uma com 122 e outra com 86 pares de base.

Figura 1. Produtos da digestão do 936 C/T.



pb – pares de base; Faixas 1 e 2 - 936 C/T; Faixas 3, 5 e 6 – 936 C/C; Faixa 4 – padrão de DNA 1 kb.

A distribuição dos alelos nos indivíduos dos grupos avaliados pode ser observada na Tabela 2. Não foram observadas diferenças significativas na comparação da distribuição de homozigotos e heterozigotos nos grupos avaliados (Correlação de Fisher – $p > 0,05$ em todas as análises).

Tabela 2. Prevalência do polimorfismo do VEGF (936 C/T) em pacientes com e sem perdas de implantes

Genótipos	Grupo Teste	Grupo Controle	Valor de p
CC	10	6	ns
CT	5	4	ns
TT	0	0	ns

Grupo Teste - com perda de implantes; Grupo Controle - com ausência de perda de implantes; as frequências foram comparadas por Teste Exato de Fisher; ns - não significativo

Discussão

VEGF é um mitógeno específico que atua como fator de sobrevivência para células endoteliais além de ser responsável pela angiogênese em condições fisiológicas e patológicas. Ele desencadeia o processo inflamatório através do aumento da permeabilidade vascular e mobilização de leucócitos²⁴. Concentrações aumentadas de VEGF livre têm sido associadas a uma variedade de doenças autoimunes e infecções inflamatórias, incluindo artrite reumatóide, retinopias proliferativas e psoríase, entre outras²⁵.

A angiogênese é um processo essencial no desenvolvimento da doença inflamatória crônica, no qual ocorre a formação de novos capilares originados das células endoteliais de vasos sanguíneos preexistentes. Ela contribui para a inflamação como resultado da capacidade dos novos vasos sanguíneos transportarem células inflamatórias, suprimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos inflamados. Neste contexto o VEGF é capaz de aumentar potencialmente a permeabilidade microvascular, estimular a proliferação de células endoteliais, induzir a expressão de enzimas proteolíticas e migração de células endoteliais, monócitos e osteoblastos que são essenciais na angiogênese¹⁴⁻¹⁵.

Um vasto número de células, incluindo plaquetas, monócitos e neutrófilos, pode secretar o fator de crescimento endotelial vascular, imprescindível para um correto desenvolvimento embrionário e para progressão de outras condições fisiológicas e patológicas, incluindo reparo tecidual, artrite reumatóide, neovascularização ocular, progressão tumoral, endometriose e doenças cardiovasculares²⁶.

A expressão de VEGF é rápida e reversivelmente induzida por exposição a baixas tensões de oxigênio. A hipoxia local é o principal indutor da expressão do gene VEGF no microambiente tumoral. Nos casos de isquemia da aorta, ocorrem aumentos dramáticos de VEGF no miocárdio para promoverem a revascularização espontânea que segue a isquemia

do miocárdio²⁴. Várias citocinas ou fatores de crescimento também regulam a expressão de VEGF e/ou induzem sua liberação. IL-1 β , IL-1 α e PGE2 induzem a expressão de VEGF promovendo a angiogênese inflamatória. IL-6 induz significativamente a expressão de VEGF em várias linhagem de células.

O VEGF exerce importante papel na saúde periodontal e é considerado um fator etiológico provável da gengivite e de sua progressão para a periodontite, provavelmente através da expansão da rede vascular^{15,17,27}. VEGF pode ser um fator de iniciação e progressão da gengivite para a periodontite, possivelmente através da expansão do leito vascular coincidente com a progressão da inflamação^{15,27}. O mecanismo envolvido é controverso, uma vez que alguns trabalhos mostram menor expressão de VEGF na gengiva normal¹⁵ e outros mostram expressão menor de VEGF na gengiva doente periimplantar¹⁷. Isto pode ser o resultado de diferentes estágios na progressão da patologia da doença periimplantar.

O VEGF foi detectado nos tecidos periodontais, dentro das células endoteliais vasculares, plasmócitos, macrófagos e também no epitélio sulcular, juncional e gengival. Esta extensiva distribuição celular associada com níveis detectáveis de VEGF no fluido crevicular de sítios saudáveis e doentes sugere que o VEGF exerce seu papel na manutenção da saúde periodontal e também na doença periodontal inflamatória crônica²⁷. Níveis de VEGF no fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite encontram-se aumentados em relação aos sítios saudáveis, e o tratamento periodontal pode resultar em redução destas concentrações. Estes dados indicam que o VEGF exerce um papel importante na progressão da doença periodontal e pode ser considerado um marcador biológico da doença periodontal progressiva²⁸. Em outro estudo¹⁷ as diferenças em termos de positividade para VEGF entre sítios saudáveis e com periimplantites revelou valores mais baixos do VEGF nas periimplantites.

Um relacionamento entre doença periodontal e periimplantite tem sido estabelecido através dos achados do aumento da microbiota anaeróbia gram negativa com elevados níveis de espiroquetas associadas com implantes perdidos²⁹. Tecidos inflamados mostram expressão aumentada de mediadores inflamatórios, muitos dos quais podem promover a angiogênese. A angiogênese pode contribuir para a severidade da inflamação com o surgimento de novos vasos sanguíneos, transporte de células proinflamatórias, suprimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos inflamados e particularmente, a vascularização periodontal é profundamente afetada durante a progressão da doença periodontal¹⁵.

O papel crítico do VEGF nos organismos é notavelmente demonstrado em camundongos deficientes de VEGF. A perda de um simples alelo do VEGF leva à morte intra-uterina desses camundongos. Elevados níveis de VEGF têm sido detectados durante a fase de granulação da cicatrização e estão presentes em tecidos com células endoteliais inativas, confirmando a importância do VEGF em potencializar a angiogênese numa variedade de tecidos, respondendo a diversos sinais. Entretanto, numerosas questões básicas ainda estão incompletamente respondidas ou mesmo sem resposta. Há fortes evidências de que as ações do VEGF no endotélio vascular são complexas e de forma nenhuma limitadas à indução de crescimento. Estudos recentes têm enfatizado o papel do VEGF no crescimento celular endotelial, na prevenção da apoptose de células endoteliais e na formação vascular colateral²⁶.

Existem evidências de que a produção de VEGF é controlada por polimorfismos identificados dentro do gene VEGF²². Estes polimorfismos funcionais podem resultar em transcrição alterada de sítios de fatores de reconhecimento, os quais podem afetar a atividade de transcrição e alterar os níveis da produção do VEGF. Particularmente, o alelo +936T é uma isoforma comum que encontra-se relacionada com a produção de VEGF. Este alelo tem sido relacionado a baixos níveis plasmáticos de VEGF em homens e mulheres saudáveis³⁰. Outro estudo mostrou que a baixa produção VEGF alelo +936T está fortemente associada com o risco aumentado para câncer bucal³¹.

No presente estudo a análise da distribuição do VEGF alelo 936C/T em pacientes com ou sem perda de implantes não identificou variações estatísticas significativas. Tendo em vista que o tamanho da amostra analisada no presente estudo foi reduzido, a investigação de mais amostras poderá confirmar a ausência da correlação deste polimorfismo com a perda de implantes ou ainda, evidenciar que o mesmo pode interferir nesta ocorrência. Entretanto, é importante ressaltar que este estudo é o primeiro a investigar a possível correlação entre o polimorfismo genético do gene VEGF na perda de implantes. Os mecanismos envolvidos nas perdas de implantes ainda são pouco compreendidos, por isso, estudos adicionais de possíveis interações entre fatores genéticos, ou outros, que possam contribuir para aumentar a compreensão destas falhas devem ser conduzidos.

Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de diferentes variantes polimórficas do gene VEGF 936 C/T não interfere na perda de implantes. Estudos adicionais devem ser conduzidos para aumentar a compreensão do papel de polimorfismos na perda de implantes.

Referências

- 1-Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. A 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 U, Gunne J, Henry P, Higuchi K, Lindén U, Bergstrom C, Steenberghe van D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 10-year prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:639-645.
- 3-Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (1). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci* 1998;106:527-551.
- 4-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.
- 5-Leite MF, Santos MC, de Souza AP, Line SR. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23:653-658.
- 6-Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:430-449.
- 7-Greenstein G & Hart TC. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73:231-247.
- 8-Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, 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;24:72-77.
- 9-Duff GW. Evidence for genetic variation as a factor in maintaining health. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):431S-5S.
- 10-Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamdrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol* 2008;35:754-767.

11-Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara, M, Ueda M, Imai H, Ohura K. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sci.* 2003;73:3313-3321.

12-Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansaker AM, Peña AS, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:380-385.

13-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;13:689-696.

14-Guneri P, Unlu F, Yesilbek B, Bayraktar F, Kokuludag A, Hekimgil M et al. Vascular endothelial growth factor in gingival tissues and crevicular fluids of diabetic and healthy periodontal patients. *J Periodontol* 2004;75:91-97.;h

15-Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70:848-852.

16-Ferrara N. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992;13:18-32.

17-Cornelini R, Artese L, Rubini C, Fioroni M, Ferrero G, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor and microvessel density around healthy and failing dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2001;16:389-393.

18-Young HS, Summers AM, Bhushan M, Brenchley PE, Griffiths CE. Single-nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor in psoriasis of early onset. *J Invest Dermatol.* 2004;122:209-215.

19-Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Ahn BM, Moon JH, Jeon SW, Park JY, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2008;23:421-427.

20-Nars HB, Chahed K, Bouaouina N, Chouchane L. Functional vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. *Clin Chim Acta* 2008;395:124-129.

21-Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, Brenchley PE, Ray DW. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3611-3616.

22-Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR et al. Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean Women. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:271.e1-271.e4.

23-Boom R, Sol CJ, Salimans MN, Jansen CL, Wertheim-van Dillen P M, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:495-503.

- 24-Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 1997;18(1):4-22.
- 25-Saito M, Usuku K, Nobuhara Y, Matsumoto W, Kodama D, Sabouri AH et al. Serum concentration and genetic polymorphism in 5'-untranslated region of VEGF is not associated with susceptibility to HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in HTLV-I infected individuals. *J of the Neurol Sci* 2004;219:157-161.
- 26-Oliveira TM, Sakai VT, Machado MAAM, Dionísio TJ, Cestari TM, Taga R, Amaral SL, Santos CF. COX-2 Inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2008;79:1062-1069.
- 27-Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodont Res* 1998;33:491-499.
- 28-Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007;78:1783-1787.
- 29-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.
- 30-Lu Hua, Shu XO, Cui y, Kataoka N, Wen W, Cai Q et al. Association of genetic polymorphisms in the VEGF gene with breast cancer survival. *Cancer Res* 2006;65(12):5015-5019.
- 31-Yapıjakis C, Vairaktaris E, Vassiliou S, Vylliotis A, Nkenk E, Nixon AM et al. The low VEGF production allele of the +936C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:787-791.

Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

N.º Registro CEP: 0014.0.213.000-09

Título do Projeto: Impacto do polimorfismo do gene VEGF na perda de implantes.

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações que você não compreendeu.

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre a diferença de uma proteína (VEGF) nas pessoas com e sem problemas relacionados a implantes. Você foi selecionado porque possui ou perdeu implantes. É importante que leia as informações abaixo para entender o seu papel nesta pesquisa e decidir se está disposto(a) a participar da mesma. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição, PUC MINAS.

É preciso entender a natureza e os riscos da sua participação e dar o seu consentimento livre e esclarecido por escrito.

Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar se o VEGF de pessoas que perderam ou não implantes é diferente.

Procedimentos do Estudo (o que será feito)

Se concordar em participar deste estudo, vamos coletar células da sua boca. Para isso, vamos usar uma espátula plástica que será passada na mucosa da sua boca. Vamos extrair o DNA das células para avaliarmos o gene do VEGF. Avaliando a seqüência do seu gene saberemos se o VEGF participa ou não da perda de implantes.

Riscos, desconfortos

Nesta pesquisa não existem riscos adicionais ao de um exame feito por um dentista. A participação na pesquisa não acarretará gasto para você, sendo totalmente gratuita.

Sigilo, privacidade e anonimato

Garantimos a manutenção do sigilo sobre as informações obtidas assim como a manutenção da sua privacidade e de seu anonimato. Apenas os pesquisadores envolvidos neste estudo terão acesso ao seu prontuário e resultados. Você não será identificado (manutenção do anonimato) caso seus dados sejam utilizados em publicações científicas. Caso deseje, você poderá saber qual foi o resultado da sua avaliação.

Participação

É importante que você esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou sair do estudo a qualquer momento sem penalidades. Caso você decida retirar-se do estudo, notifique o pesquisador.

Para obter informações adicionais

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

PUCMINAS, Faculdade de Odontologia, Programa de Mestrado em Clínicas Odontológicas.

Avenida Dom José Gaspar, 500 – Prédio 46, Coração Eucarístico

Belo Horizonte, MG- Brasil Cep. 30535-610

Telefone (31) 3319-4414; Fax (31) 3319-4415

E-mail: mestodonto@pucminas.br

Professor Rodrigo Villamarim Soares (pesquisador)

Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, você também poderá contatar o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, no telefone (31) 3319-4298, Fax (31) 3319-4229 ou E-mail: clcarv@pucminas.br

Declaração de consentimento

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado adequadamente sobre a minha participação no estudo e entendi as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi explicada de maneira adequada e que minhas dúvidas foram esclarecidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem qualquer penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos da participação no mesmo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele/ela compreendeu essa explicação.

Assinatura do pesquisador

Data