



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOCÊNCIAS**

RITA DE CÁSSIA BROKER

**ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES
LTA, TNFA, LTB E A ASSOCIAÇÃO COM A PERDA DE
IMPLANTES DENTÁRIOS**

Curitiba

2017

RITA DE CÁSSIA BROKER

**ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES
LTA, TNFA, LTB E A ASSOCIAÇÃO COM A PERDA DE
IMPLANTES DENTÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto

Co-Orientador: Andrea Duarte Doetzer

Curitiba

2017

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

B867a
2017
Broker, Rita de Cássia
Aspectos clínicos e polimorfismos nos genes LTA, TNFA, LTB e a
associação com a perda de implantes dentários / Rita de Cássia Broker,
orientadora, Paula Cristina Trevilatto; co-orientadora, Andrea Duarte Doetzer.
-- 2017
34 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017.
Bibliografia: f. 23-31

1. Odontologia. 2. Implantes dentários. 3. Polimorfismo (Genética). 4.
Carga imediata em implantes dentários. 5. Osseointegração. I. Trevilatto,
Paula Cristina. II. Doetzer, Andrea Duarte. III. Pontifícia Universidade Católica
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

RITA DE CÁSSIA BROKER

ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES *LTA*, *TNFA*, *LTB* E A ASSOCIAÇÃO COM A PERDA DE IMPLANTES DENTÁRIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof.ª Dr.ª Renata Iani Werneck
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Alexandre Resende Vieira
Programa de Pós-Graduação em Oral Biology, University of Pittsburgh

Curitiba, 10 de abril de 2017.

Dedicatória

Denis, meu companheiro de jornada, amigo de sempre e grande amor. Você foi o maior incentivador dessa e de tantas outras conquistas. Seu carinho, respeito e solidariedade foram fundamentais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai maior de infinito amor e bondade. Obrigada pela dádiva da vida, pelo seu amor, por todos os demais tesouros e até mesmo pelas dificuldades que enriquece a nossa existência e nos fortalece, para continuarmos hoje e sempre.

Aos meus pais, uma profunda gratidão e admiração. Meus primeiros mestres, me ensinaram com amor, dedicação e carinho. Confiaram em mim, depositaram suas esperanças e fizeram um esforço sem medidas para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos, Eliane e Carlos meus exemplos e grandes companheiros. Adoro os momentos que estamos juntos e agradeço pela linda família que nos tornamos.

À minha orientadora professora Paula Cristina Trevilatto. Tenho grande orgulho em ser sua orientada, é um exemplo de competência e eficiência profissional. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pelo incentivo e por acreditar e confiar que eu poderia realizar esse trabalho.

À minha co-orientadora Andrea, obrigada pela amizade, presteza de sempre, competência e disposição em ajudar.

À todos os professores da pós graduação que dedicaram um pouco de si para enriquecer o nosso conhecimento.

Agradeço em especial ao professor Cleber, por estar sempre disposto em ajudar sem medir esforços. Explicando sempre as nossas dúvidas de maneira simples e muito didática.

Aos colegas de mestrado, aprendemos muito uns com os outros. E aqui especialmente, para as grandes amigas que fiz nesse período, Valéria e Thaysa. Nos tornamos um grupo forte, unidas e companheiras, rimos muito juntas e compartilhamos momentos difíceis durante esse trajeto e claro que além do aprendizado a outra importante conquista juntas, foi a nossa amizade.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR por mais uma vez me receber e acolher, oportunizando adequado aprendizado na minha formação profissional.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página Título	1
Resumo	2
Introdução.....	3
Materiais e Métodos.....	6
Resultados.....	9
Discussão	10
Conclusão.....	13
Agradecimentos.....	14
Ilustrações	15
Tabelas.....	16
Referências.....	23
ANEXOS	32
Lista de abreviaturas e siglas	32
Parecer do comitê de ética	34

1 **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

2

3 **ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES *LTA*, *TNFA*, *LTB* E A**
4 **ASSOCIAÇÃO COM A PERDA DE IMPLANTES DENTÁRIOS**

5

6 BROKER RC¹, DOETZER AD¹, MACHADO CS¹, TREVILATTO PC¹

7

8 ¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua
9 Imaculada Conceição, 1155. Curitiba, Brasil.

10

11 Correspondência: Paula Cristina Trevilatto. Escola de Ciências da Vida,
12 Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil. Rua Imaculada Conceição,
13 1155, Prado Velho. Curitiba – PR, Brasil. CEP: 80242-980. Telefone: +55 (41)
14 3271-1505, e-mail: paula.trevilatto@pucpr.br

15

16

17

18 Os autores negam qualquer conflito de interesse.

19

20

21

22

23

24

25

1 **Resumo**

2 *Objetivo:* investigar a associação de variáveis clínicas e tag *SNPs* dos genes *LTA*
3 (rs2009658, rs2516312, rs2844482, rs2071590, rs2229094 e rs3093542), *TNFA*
4 (rs1800629 e rs2228088) e *LTB* (rs3093553) com a perda de implantes dentários
5 osseointegráveis.

6 *Materiais e métodos:* a amostra foi composta por 244 pacientes, divididos em
7 dois grupos: grupo controle (C): 163 indivíduos que não perderam nenhum
8 implante, estando em função por pelo menos 6 meses, e grupo estudo (E): 81
9 indivíduos que tiveram perda de pelo menos um implante. Após a coleta e
10 purificação do DNA, os genótipos foram determinados pela técnica da PCR em
11 tempo real. Para a análise estatística bivariada e multivariada foram considerados
12 valores de $p < 0,05$.

13 *Resultados:* após a análise multivariada, a presença de dentes ($p=0,011$), uma
14 maior quantidade de implantes colocados ($p=0,001$) e o polimorfismo rs2009658
15 do gene *LTA* no modelo aditivo ($p=0,006$) associaram-se à perda de implantes
16 dentários.

17 *Conclusão:* a presença de dentes, um maior número de implantes colocados e o
18 alelo C do rs2009658 do gene *LTA* foram significativamente associados à falha
19 de implantes.

20 *Relevância Clínica:* este estudo evidencia a relação entre fatores do hospedeiro e
21 fatores ambientais na influência da suscetibilidade à perda de implantes
22 dentários.

23

24

25

<i>Palavras-chave:</i> Perda de implantes dentários, <i>LTA</i> , <i>TNFA</i> , <i>LTB</i> , polimorfismo genético
--

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Introdução**

2

3 É crescente nos dias de hoje a valorização da qualidade de vida, da aparência e
4 do sorriso saudável, aliada a uma mastigação mais eficiente e funcional. Nesse
5 contexto, os implantes dentários têm sido considerados padrão ouro na
6 odontologia, os quais substituem um ou mais elementos dentários perdidos em
7 diferentes situações clínicas.

8 Com o advento e o sucesso dessa modalidade, muitas pessoas aderiram à
9 técnica, vislumbrando a possibilidade da reabilitação bucal, a qual apresenta uma
10 taxa de sobrevida de 83% a 98% (Simonis et al. 2010; Cakarer et al. 2014).
11 Apesar de uma alta porcentagem de sucesso, perdas de implante foram
12 relatadas variando entre 2,5% e 6,5% (Brocard et al. 2000, Montes et al. 2007;
13 Pedersen et al. 2007; Chrcanovic et al. 2016; Guillaume 2016), tornando-se
14 relevante pelo fato de cada vez mais as pessoas aderirem a essa forma de
15 tratamento.

16 O sucesso da implantodontia depende principalmente da osseointegração,
17 a qual consiste na formação e remodelação óssea sobre a superfície do implante
18 (Albrektsson et al. 1981; Jayesh & Dhinakarsamy, 2015).

19 Efetuada a instalação do implante, o insucesso poderá ocorrer antes da
20 osseointegração (precoce) ou após a colocação da carga (tardia) (Esposito et al.
21 1998a; Chrcanovic et al. 2016). Independentemente do tipo de perda, a condição
22 de falha apresenta características multifatoriais (Montes et al. 2007; Pereira et al.
23 2008), tais como: técnica cirúrgica, ausência de cuidados pós-operatórios e ainda
24 fatores do hospedeiro. Em relação ao hospedeiro, as doenças sistêmicas,
25 tabagismo, higiene oral, condição periodontal, quantidade óssea, ingestão de
26 antidepressivos, entre outros, podem influenciar a perda de implante (Doetzer et
27 al. 2014; Chrcanovic et al. 2016).

28 Montes et al. 2007 observaram que grande parte (75%) dos pacientes que
29 perderam implantes não apresentou causas clínicas aparentes e vários estudos
30 associaram esta perda a fatores genéticos (Santos et al. 2004; Montes et al.
31 2009; Costa-Junior et al. 2013; Liao et al. 2014; Pigossi et al. 2014).

32 A resposta inflamatória tem um papel fisiológico de defesa e de reparo,
33 porém quando de maneira desordenada, pode tornar-se intensa, contínua e

1 nociva ao hospedeiro (Liz-Grana 2001; Aggarwal 2003; Taylor et al. 2008;
2 Drutskaya et al. 2010). Nesse contexto, a família do fator de necrose tumoral
3 (TNF) possui importantes funções pró-inflamatória e imunológica, as quais
4 influenciam a modulação da matriz extracelular, afetando a formação e
5 remodelação óssea (Roodman 1993; Tani-Ishii et al. 1999; Gerstenfeld et al.
6 2003; Tracey et al. 2008).

7 A linfotóxina alfa (LTA) faz parte da família do TNF e é uma citocina
8 produzida por linfócitos, mediadora da resposta inflamatória aguda (Huang et al.
9 2013). É responsável pelo desenvolvimento de órgãos linfóides secundários,
10 promove o recrutamento e ativação de neutrófilos, porém é produzida em
11 pequenas quantidades e atua apenas localmente (Junt et al. 2006; Bogliolo
12 2006).

13 O TNFA é uma citocina secretada principalmente por macrófagos (Bogliolo
14 2006), considerada sentinela, pois participa das defesas do hospedeiro frente a
15 agressões locais, além de induzir a produção de outros mediadores da cascata
16 inflamatória e de destruição tecidual. Sendo assim, em níveis mais elevados no
17 organismo, pode causar inflamação excessiva e dano aos tecidos, de forma local
18 ou sistêmica (Tracey et al. 2008; Drutskaya et al. 2010). Pode ainda agir em
19 conjunto com outras citocinas, induzindo a osteólise por meio da diferenciação de
20 osteoclastos nas áreas adjacentes ao local da inflamação (Roodman 1993;
21 Campos et al. 2004; Drutskaya et al. 2010).

22 A Linfotóxina beta (LTB) faz parte também da família do TNF, é uma
23 citocina produzida por linfócitos, e uma das suas principais funções é a de
24 aumentar a indução da resposta imune (Junt et al. 2006). A LTB é uma proteína
25 transmembranar, a qual serve de âncora para a LTA, formando um composto
26 heterotrimérico (uma molécula de LTA e duas de LTB). Este composto tem
27 importante papel na organogênese linfóide e na diferenciação de células *natural*
28 *killers*. Nesse contexto, a LTB pode ter um papel regulador positivo ou negativo
29 nas respostas imunológicas e inflamatórias (Crowe 1994; Ware 2005).

30 Os genes dessas citocinas estão localizados na região do complexo
31 principal de histocompatibilidade (MHC), classe III, no braço curto do
32 cromossomo 6 do genoma humano (Taylor 2008). Este complexo compreende
33 uma região altamente polimórfica, considerada a mais densa do genoma (Xie et
34 al. 2003; Horton et al. 2008;), onde já foram identificados genes responsáveis

1 pela resposta imunológica e inflamatória (Liz-Grana 2001). Estudos de
2 polimorfismos específicos nessa região podem contribuir para a identificação de
3 genes envolvidos na propensão e modulação de inúmeras doenças (Xie et al.
4 2003).

5 O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é uma variação que ocorre
6 quando apenas uma das bases (nucleotídeo) da sequência do DNA é substituída,
7 sendo que o alelo mais raro apresenta uma frequência superior a 1% na
8 população. Os polimorfismos do gene da *LTA* rs2229094 e rs2009658, foram
9 associados a um significativo aumento do risco de diversos tipos de câncer
10 (Takei et al. 2008; Madeleine et al. 2011; Huang et al. 2013; Hardikar et al. 2015),
11 tuberculose (Abhimanyu et al. 2012), diminuição do risco de doença arterial
12 coronária (Liu et al. 2011), desenvolvimento da vitreoretinopatia proliferativa
13 (Rojas et al. 2010) e suscetibilidade ao diabetes do tipo 2 (Mahajan et al. 2010).
14 Já o rs2844482 foi associado à variação na resposta imune, após a aplicação da
15 vacina da rubéola (Pankratz et al. 2010; Dhiman et al. 2010). O polimorfismo do
16 gene *TNFA* rs1800629 pode ter influência no risco de câncer de cabeça e
17 pescoço, bem como a recorrência do tumor (Laytragoon-lewin et al 2016) e
18 potencial papel patogênico na doença arterial coronariana prematura (Ansari et
19 al. 2016), O trabalho de Rangel-Zúñiga et al. 2016 observou que os indivíduos
20 com genótipo GG do rs1800629 apresentavam uma maior ativação do estado pró-
21 inflamatório, e que este efeito pode aumentar o risco de doenças relacionadas
22 com a idade. Não houve até o momento citações com o rs 3093553 da *LTB* na
23 associação com doenças.

24 O tag SNP é um SNP que representa todos os outros SNPs de um mesmo
25 bloco (*bin*), os quais estão ligados uns aos outros por alto desequilíbrio de ligação
26 (DL, $r^2 \geq 80$). Genotipar apenas um tag SNP (o qual representa todos os outros
27 SNPs do mesmo *bin*), diminui tempo e custos, além de aumentar a força
28 estatística na investigação de associações com doenças ou condições complexas
29 (Liu et al. 2010).

30 O objetivo desse estudo foi averiguar a associação de variáveis clínicas e
31 tag SNPs dos genes *LTA*, *TNFA* e *LTB*, com a perda de implantes dentários
32 osseointegrados.

33
34

1 **Material e Método**

2 **Seleção da amostra**

3 A amostra consistiu-se no total de 3578 pacientes que foram tratados entre 1996
4 e 2006 com a instalação de implantes dentários (NEODENT® Implante
5 Osteointegrável, Curitiba-PR, Brasil) e selecionados junto ao registro de
6 pacientes do Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico
7 (ILAPEO) de Curitiba-PR, Brasil. Os pacientes eram provenientes da região sul
8 do Brasil. Os pacientes foram esclarecidos sobre a natureza do estudo e, os que
9 concordaram em participar da pesquisa, assinaram um termo de consentimento
10 do Conselho de Revisão Institucional do Comitê de Ética em Pesquisa da
11 PUCPR, Brasil, protocolo 323. Do total dos pacientes tratados, 126 indivíduos
12 (3,5%) tiveram perda de pelo menos um implante. Desses, 81 indivíduos
13 compuseram o grupo estudo (E). O grupo controle (C) foi composto por 163
14 indivíduos, selecionados entre 3452 pacientes restantes, os quais não perderam
15 nenhum implante, estando em função por pelo menos 6 meses. Sendo assim,
16 este estudo foi composto no total por 244 indivíduos (n=244), pareados por idade,
17 gênero e tabagismo (Tabela 1). Os pacientes que apresentassem gravidez ou
18 lactação, infecção por HIV, aparelho ortodôntico, presença de gengivite ou
19 periodontite ulcerativa necrosante não foram incluídos nesse estudo.

20 Os parâmetros utilizados foram coletados por meio de um questionário
21 contendo informações sobre perfil socioeconômico, história médica, uso de
22 medicação, hábitos de higiene bucal, visitas ao dentista, presença ou ausência
23 de dentes e número de implantes colocados (Tabela 2). A condição periodontal
24 foi observada por um único examinador (F.A.P.) com o uso de uma sonda
25 convencional milimetrada Hufriedy™ (Chicago, USA). O índice gengival (IG) (Loe,
26 1967), o índice de placa (IP) (Silness & Loe 1964), o índice de cálculo (IC)
27 (Greene & Vermillion, 1964), a profundidade de sondagem (PS), a perda de
28 inserção clínica (PIC) e a presença de mobilidade dentária foram avaliados
29 (Tabela 3).

30

31

32

33

1 **Coleta e purificação do DNA**

2 Os indivíduos que compuseram a amostra realizaram um bochecho com solução
3 de 5 ml de glicose 3% durante 1 minuto. Após o bochecho, os pacientes foram
4 orientados a lançar este líquido em recipiente apropriado e foi então realizada a
5 raspagem da mucosa jugal com o auxílio de uma espátula de madeira
6 esterilizada. Concluída a raspagem, a espátula de madeira era agitada dentro do
7 frasco contendo a solução expelida pelo paciente (Trevilatto & Line 2000). As
8 células epiteliais bucais obtidas passaram por processo de centrifugação a 2000
9 rpm durante 10 minutos para serem sedimentadas. Este processo resultou em
10 um sobrenadante que foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensão em
11 1300 μ l de tampão de extração [Tris-HCl 10 mM (pH 7,8), EDTA 5 mM, SDS
12 0,5%]. Foram adicionados à solução 10 μ l de proteinase K (20 mg/ml),
13 permanecendo em repouso durante a noite a 65°C. A purificação do DNA foi
14 realizada adicionando-se acetato de amônio 10 M, precipitado com isopropanol e
15 resuspensão com 50 μ l de Tris 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1 mM (Aidar & Line 2007).

16

17 **Seleção dos marcadores e genotipagem**

18 Os marcadores tag SNPs dos genes *LTA*, *TNFA* e *LTB* foram selecionados de
19 acordo com a informação disponível no site internacional do Projeto *HapMap*
20 (www.hapmap.org), *release 24/fase 2* de Nov. 2008 (Thorisson et al. 2005) e
21 capturam toda a informação desses três genes. Todos os marcadores
22 selecionados apresentaram uma frequência alélica mínima de 5% na população
23 YRI (Africana). Foram considerados tag SNPs, os SNPs com $r^2 \geq 0,8$, ou seja, em
24 alto grau de DL.

25 Foram selecionados seis tag SNPs do gene *LTA*: rs2009658, rs2516312,
26 rs2844482, rs2071590, rs2229094 e rs3093542; dois tag SNPs do gene *TNFA*:
27 rs1800629 e rs2228088 e um tag SNP do gene *LTB*: rs3093553. Os tag SNPs
28 foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500
29 Real-Time PCR System) (Lee et al. 1993).

30

31

32

33

1 **Análise estatística**

2 O software Haploview 4.2 foi utilizado para estimar o equilíbrio de Hardy-
3 Weinberg, estipular o alelo associado ou de referência para cada tag SNP e
4 ainda analisar o DL entre os tag SNPs dos genes *LTA*, *TNFA* e *LTB*. A versão
5 SPSS 20.0 foi usada para as análises estatísticas. As variáveis nominais foram
6 expressas em número e frequência e analisadas pelo teste qui-quadrado de
7 Pearson e o teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram expressas como
8 média e desvio padrão, sendo o teste U de Mann-Whitney utilizado. Valores de
9 $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para a análise multivariada, foi utilizado
10 o modelo de regressão logística binária ajustado para avaliar as frequências
11 genotípicas que incluíram as variáveis com significância de $p < 0,20$.

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1 **Resultados**

2 **Parâmetros clínicos**

3 Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e E para as
4 variáveis idade, gênero e tabagismo ($p>0,05$).

5 Perfil socioeconômico, história médica, uso de medicação, hábitos de
6 higiene bucal e visitas ao dentista não foram associados à perda de implantes. Já
7 a presença de dentes ($p=0,038$) foi associada à perda de implantes. Dos 81
8 pacientes que perderam implantes, 75 apresentavam dentes (92,6%). Também, o
9 número maior de implantes colocados foi associado ao grupo estudo ($p=0,010$).

10 Na avaliação periodontal, com relação aos pacientes parcialmente
11 edêntulos, a quantidade de dentes presentes, índice gengival, índice de placa e
12 índice de cálculo não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre
13 os grupos C e E. Entretanto, a menor profundidade sondagem ($p=0,005$) foi
14 associada à perda de implantes, porém, a perda de inserção e a mobilidade
15 dentária não foram associadas às falhas de implantes.

16

17 **Análise genética**

18 A distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos estudados está
19 apresentada na tabela 4. A distribuição dos genótipos dos nove tag SNPs foi
20 considerada consistente pela hipótese de Hardy-Weinberg na população controle.
21 A análise do DL mostrou que, com exceção do DL=96% entre rs2009658 e o
22 rs2844482, os demais tag SNPs apresentaram um DL de $r^2<80\%$ (Fig. 1).

23 Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os
24 grupos na distribuição das frequências do gene da *LTA*. O alelo C do tag SNP
25 rs2009658 nos modelos aditivo ($p=0,021$) e dominante para o alelo C ($p=0,017$)
26 foi associado à perda de implantes.

27 Após a análise multivariada, a presença de dentes, uma maior
28 quantidade de implantes colocados e o alelo C do rs2009658 do gene *LTA* no
29 modelo aditivo, mantiveram-se associados com a perda de implantes.

30

31

32

1 **Discussão**

2 A osseointegração é um processo fundamental para o sucesso do implante
3 dentário. Após o procedimento cirúrgico, o processo do reparo ósseo é iniciado
4 através de complexas interações celulares, e diversos fatores podem interferir
5 (Roodman 1993) na modulação da osseointegração dos implantes dentários
6 (Gaya et al. 2016).

7 Entre esses fatores, os mais estudados são os relacionados ao
8 hospedeiro, tais como: quantidade e qualidade óssea (Montes et al. 2007),
9 osteoporose, fumo, presença de dentes (Alsaadi et al. 2007), índice de placa e
10 cálculo, mobilidade dentária (Doetzer et al. 2014), estado geral de saúde
11 comprometido (Esposito et al. 1998b) e associações genéticas (Leite et al. 2008,
12 Montes et al. 2009, Liao et al. 2014, Pigossi et al. 2014). Para Pereira et al. 2008,
13 a investigação sobre a influência genética contribui para uma melhor
14 compreensão sobre porque alguns pacientes apresentam falhas relacionadas aos
15 implantes dentários, sem uma causa clínica evidente.

16 Para esse estudo, idade, gênero e tabagismo não foram associados
17 com a perda de implantes, o que pode ser explicado pelo fato de os pacientes
18 terem sido pareados entre os grupos. Além disso, no presente estudo os
19 indivíduos não foram agrupados por etnia, pelo motivo de a população brasileira
20 ser muito heterogênea. Ainda, segundo Parra et al. 2003, equacionar os
21 indivíduos por cor ou raça é um preditor fraco sobre a ancestralidade no Brasil,
22 possivelmente devido à miscigenação.

23 Os indivíduos com presença de dentes apresentaram maior risco
24 relacionado à perda de implantes, assim como relatado nos estudos de Alsaadi et
25 al. 2007. A Inflamação gengival e o acúmulo de placa podem contribuir
26 consideravelmente na falha de implantes em pacientes que apresentam dentes
27 (Steenberghe et al. 1990). Em contrapartida a redução de bactérias relacionadas
28 à periodontite foi notável após a extração de todos os dentes (Quirynen et al.
29 2011), o que pode contribuir para o sucesso de implantes em pacientes
30 totalmente edêntulos (Gaya et al. 2016).

31 Na variável número de implantes colocados, houve uma diferença
32 estatisticamente significativa entre os grupos. Portanto, um maior número de

1 implantes colocados pode elevar o risco relacionado à perda (Naert et al. 2002;
2 Dirschnabel et al. 2011).

3 Na avaliação do status periodontal, uma menor PS foi associada com a
4 perda de implantes, assim como em outros estudos (Montes et al. 2009; Alvim-
5 Pereira et al. 2008). Porém, foi constatada uma diferença média de apenas 0,16
6 mm de PS entre controle e estudo, o que não demonstra uma representatividade
7 clínica relevante. Além do mais, na análise multivariada, a associação não se
8 manteve. As demais variáveis relativas ao periodonto não foram associadas com
9 a perda de implantes dentários.

10 Os achados clínicos desta amostra referentes à posição dos implantes,
11 dimensão, design, estabilidade, plataforma, técnica cirúrgica, enxerto ósseo,
12 quantidade e qualidade óssea foram publicados no trabalho de Alvim-Pereira et
13 al. 2008.

14 Muitos trabalhos já evidenciaram a contribuição genética para a perda de
15 implantes dentários. Os autores atribuem essa perda, sem causa clínica
16 aparente, a polimorfismos genéticos, que podem influenciar o processo de
17 osseointegração dos implantes dentários (Santos et al. 2004; Leite et al. 2008;
18 Montes et al. 2007; Gresser et al. 2013; Costa-Junior et al. 2013; Liao et al. 2014;
19 Pigossi et al. 2014). Até o momento não foram ainda pesquisados trabalhos
20 relacionados com os genes *LTA*, *TNFA* e *LTB* e a perda de implantes. As
21 proteínas codificadas pelos genes *LTA*, *TNFA* e *LTB* desempenham um
22 importante papel nos vários processos fisiológicos, principalmente na complexa
23 rede da cascata inflamatória, a qual a princípio age localmente, induzindo à
24 vasodilatação e ao extravazamento de células leucocitárias. Porém, uma
25 alteração na sua expressão pode gerar um ambiente desfavorável e prejudicial
26 ao organismo (Aggarwal 2003; Medzhitov 2010; Bauer et al. 2012).

27 Em relação ao gene *LTA*, alguns trabalhos já evidenciaram associação de
28 polimorfismos deste gene com patologias distintas. Para Madeleine et al. 2012, o
29 câncer pode se desenvolver a partir de uma longa resposta pró-inflamatória, além
30 dos fatores genéticos e efeitos cumulativos de exposição hormonal e ambiental.
31 Para o câncer de mama, houve um aumento significativamente elevado em
32 mulheres de meia idade associado ao rs2009658 do gene da *LTA*, alelo C>G.
33 Ainda, para Oikari et al. 2013, é provável que a *LTA* desempenhe um papel
34 capaz de desencadear enxaqueca, já que as citocinas apresentam papel na

1 inflamação, podendo induzir dor de cabeça. O rs2844482 do gene da LTA
2 observado em alto grau de DL com rs2009658 ($r^2=96\%$) neste trabalho foi
3 também alvo de pesquisas com relação à enxaqueca e com a variação da
4 resposta imune na vacina da rubéola (Dhiman et al. 2010; Pankratz et al. 2010).
5 Nesta pesquisa, o alelo C do rs2009658 do gene *LTA* nos modelos aditivo
6 dominante foi associado à perda de implantes. O rs2009658 do gene *LTA* está
7 localizado em uma região intrônica. Este polimorfismo pode capturar a
8 informação de outro polimorfismo funcional causal por alto DL. Outra hipótese da
9 atuação de polimorfismos em regiões intrônicas é interferir no *splicing* dos éxons,
10 o que poderia alterar a estrutura primária da proteína e conseqüentemente sua
11 função (Ramírez-Bello et al. 2013). Além disso, estando em região próxima à
12 extremidade 5' (Madeleine et al. 2011), poderia promover dobras no DNA,
13 modificando a afinidade de fatores de transcrição (Tress et al. 2007).

14 Após análise multivariada, o grupo de variáveis que se mantiveram
15 associadas predispondo a um resultado desfavorável foram: presença de dentes,
16 maior número de implantes colocados e o rs2009658 do gene *LTA* no modelo
17 aditivo.

18 Embora estudos tenham associado outras variáveis clínicas com a perda
19 de implantes (Naert et al. 2002; Nogueroles et al. 2006), muitas vezes os fatores
20 clínicos sozinhos não explicam as taxas de insucesso em alguns pacientes
21 (Kronström et al. 2001; Montes et al. 2008). Por isso, nesse contexto, mostra-se
22 relevante investigar a resposta do hospedeiro juntamente com parâmetros
23 clínicos para um melhor entendimento em relação à perda de implantes
24 dentários.

25 Como limitações desse estudo, o número amostral foi relativamente baixo,
26 porém foi realizado o cálculo do poder estatístico da amostra e este apresentou
27 valor superior a 50%. Uma segunda limitação foi a baixa frequência dos alelos
28 mais raros para alguns polimorfismos, diminuindo ainda mais o poder estatístico
29 para a identificação das associações investigadas. No entanto, mesmo com
30 poder estatístico relativamente baixo, o que aumenta o risco para falsos
31 negativos, o polimorfismo rs2009658 do gene *LTA* foi associado ao aumento da
32 suscetibilidade para a perda de implantes.

33
34

1 **Conclusão**

2 Para a população deste estudo, alelo C do rs2009658 do gene *LTA* foi associado
3 com a perda de implantes, bem como a presença de dentes e um maior número
4 de implantes colocados. Estes resultados reforçam a ideia da interação entre
5 condições clínicas e fatores genéticos, que juntos aumentam o risco à
6 suscetibilidade à perda de implantes dentários.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Agradecimentos**

2 Este estudo foi apoiado pelo Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino
3 Odontológico (ILAPEO) de Curitiba-PR, Brasil.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

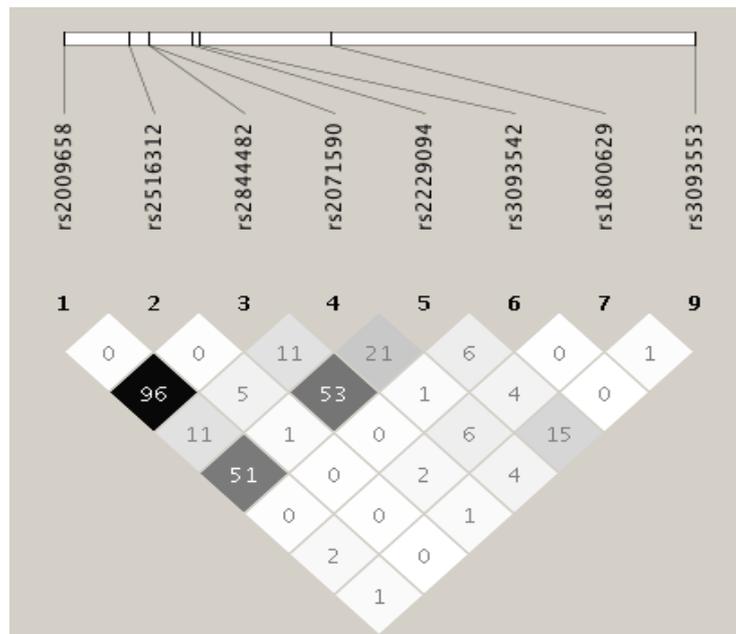
19

20

21

22

1 Ilustrações



2

3 **Figura 1** Análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os tag SNPs ($r^2 \leq 80\%$)
4 *LTA*, *LTB* e *TNFA* na população YRI. O número dentro dos quadrados indica a
5 frequência de DL. A intensidade de cor dos quadrados reflete o grau de DL entre
6 os polimorfismos: a cor mais intensa indica maior DL.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

1 **Tabelas**

2 **Tabela 1.** Características sociodemográficas dos indivíduos do total da amostra
3 (n=244).

	Grupo controle (n=163)	Grupo estudo (n=81)	Valor de p	OR (IC 95%)
Idade^a	51,0 ± 11,3	52,9 ± 11,0	0,216*	-
Gênero^b				
Feminino	111 (68,1)	51 (63,0)	0,424**	1,25 (0,71-2,19)
Masculino	52 (31,9)	30 (37,0)		
Tabagismo^b				
Sim	32 (19,6)	15 (18,5)	0,835**	1,07 (0,54-2,12)
Não	131 (80,4)	66 (81,5)		

4 a: média ± desvio padrão b: número (frequência); * teste U de Mann-Whitney; **Teste qui-quadrado de
5 Pearson; OR: *Odds Ratio*; IC (intervalo de confiança).

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

1 **Tabela 2.** Características clínicas dos pacientes (n=244).

	Grupo controle (n=163)	Grupo estudo (n=81)	Valor de p	OR (IC 95%)
Condição socioeconômica^a				
A1/A2/B1	84 (51,5)	40 (49,4)	0,752*	1,09 (0,64-1,85)
B2/C/D	79 (48,5)	41(50,6)		
Doença sistêmica^a				
Sim	111 (68,1)	60 (74,1)	0,337*	1,33 (0,73-2,43)
Não	52 (31,9)	21 (25,9)		
Doença reumática^a				
Sim	32 (19,6)	21 (25,9)	0,262*	1,43 (0,76-2,68)
Não	131 (80,4)	60 (74,1)		
Osteoporose^a				
Sim	3 (1,8)	2 (2,5)	1,000**	1,35 (0,22-8,24)
Não	160 (98,2)	79 (97,5)		
Tratamento médico^a				
Sim	63 (38,7)	37 (45,7)	0,293*	1,33 (0,77-2,28)
Não	100 (61,3)	44 (54,3)		
Reposição Hormonal^a				
Sim				
Não	63 (38,7)	37 (45,7)	0,293*	1,33 (0,77-2,28)
	100 (61,3)	44 (54,3)		
Medicação de uso contínuo^a				
Sim	66 (40,5)	37 (45,7)	0,440*	1,23 (0,72-2,11)
Não	97 (59,5)	44 (54,3)		
Antinflamatórios não-estereoidais^a				
Sim	6 (3,7)	7 (8,8)	0,994**	2,47 (0,80-7,63)
Não	155 (96,3)	73 (91,3)		
Antinflamatórios estereoidais^a				
Sim	4 (2,5)	2 (2,5)	1,000**	1,00 (0,18-5,61)
Não	157 (97,5)	78 (97,5)		
Número de escovações diárias^a				
Menos de 3 vezes	44 (27,0)	18 (22,2)	0,420*	0,77 (0,41-1,44)
3 vezes ou mais	119 (73,0)	63 (77,8)		
Uso do fio dental^a				
Sim	108 (66,3)	55 (68,8)	0,698*	0,89 (0,50-1,58)
Não	55 (33,7)	25 (31,3)		

Uso de enxaguatório				
bucal^a	55 (33,7)	25 (31,3)	0,698*	1,12 (0,63-1,98)
Sim	108 (66,3)	55 (68,8)		
Não				
Consultas odontológicas^b	6,43 ± 4,73	6,53 ± 4,64	0,959***	
Edentulismo^a				
Edentulismo	28 (17,2)	6 (7,4)	0,038*	2,59 (1,02-6,54)
Dentes presentes	135 (82,8)	75 (92,6)		
Implantes colocados^b	3,99 ± 2,95	5,59 ± 3,75	0,010***	

1 a: número (frequência); b: média ± desvio padrão; * Teste qui-quadrado de Pearson; **Teste exato de Fisher;
2 *** teste U de Mann-Whitney; OR: *Odds Ratio*; IC (intervalo de confiança).

- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27

1 **Tabela 3.** Status periodontal dos pacientes parcialmente edêntulos (n=209).

Status periodontal	Grupo controle (n=134)	Grupo estudo (n=75)	Valor de p	OR (IC 95%)
Número de dentes ^a	20,3 ± 6,29	18,6 ± 7,13	0,106*	-
Índice gengival ^a	0,61 ± 0,37	0,63 ± 0,54	0,438*	-
Índice de placa ^a	0,12 ± 0,24	0,25 ± 0,43	0,349*	-
Índice de cálculo ^a	0,07 ± 0,12	0,14 ± 0,24	0,092*	-
PS (mm) ^a	2,71 ± 0,46	2,55 ± 0,47	0,005*	-
PIC (mm) ^a	3,59 ± 0,85	3,63 ± 1,09	0,636*	-
Mobilidade ^b				
Sim	18 (13,3)	16 (21,3)	0,132**	1,76 (0,83-3,70)
Não	117 (86,7)	59 (78,7)		

2 a: média ± desvio padrão; b: número (frequência); * teste U de Mann-Whitney; **Teste qui-quadrado de
3 Pearson; OR: *Odds Ratio*; IC (intervalo de confiança).

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

1 **Tabela 4.** Análise genotípica dos tag SNPs nos genes *LTA*, *TNF*, *LTB* no
 2 modelo aditivo.

Gene	Tag SNPs DbSNP ID ^a	Variação ^b [1/2]	Grupo	Homozigoto 1 n (%)	Heterozigoto 2 n (%)	Homozigoto 3 n (%)	Valor de <i>p</i>
<i>LTA</i>	rs2009658	[G/C]	Controle	GG 106 (71,6)	CG 38 (25,7)	CC 4 (2,7)	0,021
			Estudo	32 (54,2)	24 (40,7)	3 (5,1)	
	rs2516312	[A/G]	Controle	AA 153 (95,0)	AG 8 (5,0)	GG -	0,696
			Estudo	76 (93,8)	5 (6,2)	-	
	rs2844482	[C/T]	Controle	CC 110 (68,8)	CT 46 (28,8)	TT 4 (2,5)	0,155
			Estudo	49 (60,5)	28 (34,6)	4 (4,9)	
rs2071590	[C/T]	Controle	CC 74 (45,4)	CT 67 (41,1)	TT 22(13,5)	0,838	
		Estudo	32 (40,0)	40 (50,0)	8 (10,0)		
rs2229094	[A/G]	Controle	AA 84 (52,8)	AG 59 (37,1)	GG 16 (10,1)	0,659	
		Estudo	36(48,0)	32 (42,7)	7 (9,3)		
rs3093542	[G/C]	Controle	GG 155 (95,7)	CG 7 (4,3)	CC -	0,308	
		Estudo	74 (92,5)	6 (7,5)	-		
<i>TNFA</i>	rs1800629	[A/G]	Controle	GG 128 (79,0)	AG 32 (19,8)	AA 2 (1,2)	0,739
			Estudo	63(79,7)	16 (20,3)	0 (0,0)	
	rs2228088	[G/T]	Controle	GG 160 (100,0)	GT -	TT -	-
			Estudo	78 (100,0)	-	-	
<i>LTB</i>	rs3093553	[C/A]	Controle	AA 132 (85,2)	CA 21 (13,5)	CC 2 (1,3)	0,952
			Estudo	65 (85,5)	10 (13,2)	1 (1,3)	

3 a: SNP identificado na base de dados do NCBI; b: O primeiro alelo é o ancestral, e o segundo alelo é de
 4 referência; *Teste qui-quadrado de Pearson

5
6
7
8
9
10
11

1 **Tabela 5.** Análise dos genótipos dos tag SNPs nos genes *LTA*, *TNF* e *LTB* no
 2 modelo dominante.

Gene	Tag SNPs DbSNP ID ^a	Variação ^b [1/2]	Grupo	Genótipos n (%)	Genótipos n (%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	
<i>LTA</i>	rs2009658 (Dom C)	[C/G]	Controle	CG + CC	GG	0,017*	0,47 (0,25-0,87)	
				42 (28,4)	106 (71,6)			
	Estudo	27 (45,8)	32 (54,2)	0,765**	0,79 (0,25-2,51)			
		AG + GG	AA					
	rs2516312 (Dom G)	[A/G]	Controle	8 (5,0)	153 (95,0)			
				Estudo	5 (6,2)	76 (93,8)		
rs2844482 (Dom T)	[C/T]	Controle	CT+TT	CC	0,201*	0,69 (0,39-1,21)		
			50 (31,3)	110 (68,8)				
Estudo	32 (39,5)	49 (60,5)	0,425*	0,80 (0,46-1,38)				
	CT+TT	CC						
rs2071590 (Dom T)	[C/T]	Controle	89 (54,6)	74 (45,4)				
			Estudo	48 (60,0)	32 (40,0)			
rs2229094 (Dom G)	[A/G]	Controle	AG+GG	AA	0,490*	0,82 (0,47-1,42)		
			75 (47,2)	84 (52,8)				
Estudo	39 (52,0)	36 (48,0)	0,365**	0,55 (0,18-1,71)				
	CG + CC	GG						
rs3093542 (Dom C)	[G/C]	Controle	7 (4,3)	155 (95,7)				
			Estudo	6 (7,5)	74 (92,5)			
<i>TNFA</i>	rs1800629 (Dom G)	[A/G]	Controle	AG+GG	AA	1,000**	-	
				160 (98,8)	2 (1,2)			
Estudo	79 (100,0)	0 (0,0)	rs2228088 (Dom T)	[G/T]	Controle	GG	GT	
	-	-				-	-	
Estudo	-	-	Controle	[C/A]	153(98,7)	2 (1,3)	1,000**	1,02 (0,91-11,42)
	-	-						
<i>LTB</i>	rs3093553 (Dom A)	[C/A]	Controle	AC + AA	CC	1,000**	1,02 (0,91-11,42)	
				153(98,7)	2 (1,3)			
Estudo	75 (98,7)	1 (1,3)	Estudo	75 (98,7)	1 (1,3)			

3 a: SNP identificado na base de dados do NCBI; b: O primeiro alelo é designado o menor alelo, e o segundo
 4 alelo é designado o maior alelo; *Teste Qui-quadrado de Pearson; **Teste exato de Fisher; OR: Odds Ratio
 5 IC(intervalo de confiança)

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

1 **Tabela 6.** Análise do genótipo do tag SNPs no gene da *LTA*, *TNF* e *LTB* no
 2 modelo recessivo.

Gene	Tag SNPs DbSNP ID ^a	Varição ^b [1/2]	Grupo	Genótipos n (%)	Genótipos n (%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)
<i>LTA</i>	rs2009658 (Rec C)	[C/G]	Controle	CG + GG	CC	0,409**	0,51 (0,11-2,39)
				144 (97,3)	4 (2,7)		
	Estudo	56 (94,9)	3 (5,1)				
		rs2516312 (Rec G)	[A/G]	Controle	AG + AA	GG	-
	161 (100)				-		
	Estudo	81 (100)	-				
rs2844482 (Rec T)		[C/T]	Controle	CT+CC	TT	0,448**	0,49 (0,12-2,02)
	156 (97,5)			4 (2,5)			
Estudo	77 (95,1)	4 (4,9)					
	rs2071590 (Rec T)	[C/T]	Controle	CT+CC	TT	0,436*	1,40 (0,59-3,31)
141 (86,5)				22 (13,5)			
Estudo	72 (90,0)	8 (10,0)					
	rs2229094 (Rec G)	[A/G]	Controle	AG+AA	GG	0,861*	1,08 (0,42-2,76)
143 (89,9)				16 (10,1)			
Estudo	68 (90,7)	7 (9,3)					
	rs3093542 (Rec C)	[C/G]	Controle	CG + GG	CC	-	-
162 (100)				-			
Estudo	80 (100)	-					
	<i>TNFA</i>	rs1800629 (Rec G)	[A/G]	Controle	AG+AA	GG	0,895*
34 (21,0)					128(79,0)		
Estudo	16 (20,3)	63 (79,7)					
	rs2228088 (Rec T)	[G/T]	Controle	GT+GG	TT	-	-
-				-			
Estudo	-	-					
	<i>LTB</i>	rs3093553 (Rec A)	[C/A]	Controle	AC + CC	AA	0,941*
23 (14,8)					132 (85,2)		
Estudo	11(14,5)	65 (85,5)					

3 a: SNP identificado na base de dados do NCBI; b: O primeiro alelo é designado o menor alelo, e o segundo
 4 alelo é designado o maior alelo; *Teste Qui-quadrado de Pearson; **Teste exato de Fisher; OR: Odds Ratio
 5 IC(intervalo de confiança).

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

1 **Referências**

- 2 Abhimanyu, Bose, M. & Jha, P. (2012) Footprints of genetic susceptibility to
3 pulmonary tuberculosis: cytokine gene variants in north Indians. *Indian Journal of*
4 *Medical Research* **135**: 763-770.
- 5
- 6 Aggarwal, B. B. (2003) Signalling Pathways of the Superfamily: A Double-Edged
7 Sword. *Nature* **3**: 745-756.
- 8
- 9 Aidar, M. & Line, S.R. (2007) A simple and cost-effective protocol for DNA
10 isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal* **18**:148–152.
- 11 Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A. & Lindström, J. (1981)
12 Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting,
13 direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*
14 **52**:155-170.
- 15 Alsaadi, G., Quirynen, M., Komárek, A. & Van Steenberghe, D. (2007) Impact of
16 local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment
17 connection. *Journal of Clinical Periodontology* **34**: 610–617.
- 18 Alvim-Pereira, F., Montes, C.C., Mira, M.T. & Trevilatto, P.C. (2008) Genetic
19 Susceptibility to Dental Implant Failure: A Critical Review. *The International*
20 *journal of oral & maxillofacial implants* **23**: 409–416.
- 21 Alvim-Pereira, F., Montes, C.C., Thome, G., Olandoski, M. & Trevilatto, P.C.
22 (2008) Analysis of association of clinical aspects and vitamin D receptor gene
23 polymorphism with dental implant loss . *Clinical oral implants research* **19**:786–
24 795.
- 25 Ansari, W.M., Humphries, S.E., Naveed, A.K., Khan, O.J. & Khan, D.A. (2016)
26 Influence of cytokine gene polymorphisms on proinflammatory/anti-inflammatory
27 cytokine imbalance in premature coronary artery disease. *Postgraduate medical*
28 *journal*.
- 29 Bauer, J., Namineni, S., Reisinger, F., Zoller, J., Yuan, D. & Heikenwalder, M.
30 (2012) Lymphotoxin, NF-KB, and Cancer: The Dark Side of Cytokines. *Digestive*

- 1 *Diseases* **30**: 453-468.
- 2 Bogliolo L. Bogliolo Patologia. Guanabara Koogan. 2006, 7^a ed, cap. 7 e 9.
- 3 Brocard, D., Barthet, P., Baysse, E., Duffort, J.F., Eller, P., Justumus, P., Marin,
4 P., Oscaby, F., Simonet, T., Benqué, E. & Brunel, G. (2000) A multicenter report
5 on 1,022 consecutively placed ITI implants: a 7-year longitudinal study. *The*
6 *International journal of oral & maxillofacial Implants* **15**: 691-700.
- 7
- 8 Cakarar, S., Selvi, F., Can, T., Kirli, I., Palancioglu, A., Keskin, B., Yaltirik, M. &
9 Keskin, C. (2014) Investigation of the Risk Factors Associated With the Survival
10 Rate of Dental Implants. *Implant Dentistry* **23**: 328-333.
- 11 Campos, M.I., Santos, M.C., Trevilatto, P.C., Scarel-Caminaga, R.M., Bezerra,
12 F.J. & Line, S. R. (2004) Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A)
13 gene polymorphism. *Implant Dentistry* **13**: 95-101.
- 14 Chrcanovic, B.R., Kisch, J., Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2016) Factors
15 Influencing Early Dental Implant Failures. *Journal of Dental Research* **4**:1-8.
- 16 Costa-Junior, F.R., Alvim-Pereira, C.C., Alvim-Pereira, F., Trevilatto, P.C., de
17 Souza, A.P. & Santos, M.C. (2013) Influence of MMP-8 promoter polymorphism in
18 early osseointegrated implant failure. *Clinical oral investigations* **17**: 311-316.
- 19 Crowe, P.D., VanArsdale, T.L., Walter, B.N., Ware, C.F., Hession. C., Ehrenfels,
20 B., Browning, J.L., Din, W.S., Goodwin, R.G. & Smith, C.A. (1994) A Lymphotoxin
21 Beta Specific Receptor. *Science* **264**: 707-710.
- 22
- 23 Dhiman, N., Haralambieva, I.H., Kennedy, R.B., Vierkant, R.A., O'Byrne, M.M.,
24 Ovsyannikova, I.G., Jacobson, R.M. & Poland, G.A. (2010) SNP/haplotype
25 associations in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to rubella
26 vaccine. *Immunogenetics* **62**: 197-210.
- 27
- 28 Dirschnabel, A.J., Alvim-Pereira, F., Alvim-Pereira, C.C., Bernardino, J.F., Rosa,
29 E.A. & Trevilatto, P.C. (2011) Analysis of the association of IL1B (C-511T)
30 polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon.
31 *Clinical oral implants research* **22**: 1235-1241.

- 1 Doetzer, A.D., Schlipf, N., Alvim-Pereira, F., Alvim-Pereira, C.C., Werneck, R.,
2 Riess, O., Bauer, P. & Trevilatto, P.C. (2014) Lactotransferrin Gene (*LTF*)
3 Polymorphisms and Dental Implant Loss: A Case-Control Association Study.
4 *Clinical implant dentistry and related research* **17** 550-561.
- 5 Drutskaya, M.S., Efimov, G.A., Kruglov, A.A., Kuprash, D.V. & Nedospasov, S.A.
6 (2010) Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer. *International Union of*
7 *Biochemistry and Molecular Biology life* **62**: 283-289.
- 8 Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen P. (1998) Biological factors
9 contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I) Success criteria and
10 epidemiology. *European journal of oral Sciences* **106**: 527–551.
- 11 Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U. & Thomsen P. (1998) Biological factors
12 contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II) Etiopathogenesis.
13 *European journal of oral Sciences* **106**: 721–764.
- 14 Gerstenfeld, L.C., Cho, T.J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G.L.,
15 Graves, D.T. & Einhorn, T.A. (2003) Impaired Fracture Healing in the Absence of
16 TNF- α Signaling: The Role of TNF- α in Endochondral Cartilage Resorption.
17 *Journal of bone and mineral research* **18**: 1584-1592.
- 18 Greene, J.C. & Vermillion, J.R. (1964) The Simplified oral hygiene index. *The*
19 *Journal of the American Dental Association* **68**: 7-13.
- 20 Guillaume B. (2016) Dental implants: A review. *Morphologie* **100**: 1-10.
- 21 Hardikar, S., Johnson, L.G., Malkki, M., Petersdorf, E.W., Galloway, D.A.,
22 Schwartz, S.M. & Madeleine, M.M. (2015) A population-based case-control study
23 of genetic variation in cytokine genes associated with risk of cervical and vulvar
24 cancers. *Gynecologic oncology* **139**: 90-96.
- 25
- 26 Horton, R., Gibson, R., Coghill, P., Miretti, M., Allcock, R.J., Almeida, J., Forbes,
27 S., Gilbert, J.G., Halls, K., Harrow, J.L., Hart, E., Howe, K., Jackson, D.K., Palmer,
28 S., Roberts, A.N., Sims, S., Stewart, C.A., Traherne, J.A., Trevanion, S., Wilming,
29 L., Rogers, J., de Jong, P.J., Elliott, J.F., Sawcer, S., Todd, J.A., Trowsdale, J. &

- 1 Beck, S. (2008) Variation analysis and gene annotation of eight MHC.
2 *Immunogenetics* **60**: 1– 18.
- 3 Huang, Y., Yu. X., Wang, L., Zhou, S., Sun, J., Feng, N., Nie, S., Wu, J., Gao, F.,
4 Fei, B., Wang, J., Lin, Z., Li, X., Xu, L., Gao, X., Ye, M. & Duan, S. (2013) Four
5 Genetic Polymorphisms of Lymphotoxin-Alpha Gene and Cancer Risk: A
6 Systematic Review and Meta- Analysis. *Plos One* **8**: 1-11.
- 7 Jacobi-Gresser, E., Huesker, K. & Schütt, S. (2013) Genetic and immunological
8 markers predict titanium implant failure: a retrospective study. *International journal*
9 *of oral and maxillofacial surgery* **42**: 537–543.
- 10 Jayesh, S.R. & Dhinakarsamy, V. (2015) Osseointegration. *Journal of pharmacy &*
11 *bioallied sciences* **7**: 226–229.
- 12 Ramírez-Bello J. Vargas-Alarcón, G. Tovilla-Zárate, C & Fragoso, J.M. (2013).
13 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP
14 reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades
15 complejas. *Gaceta Médica de México* **149**: 220-228.
- 16 Junt, T., Tumanov, A.V., Harris, N., Heikenwalder, M., Zeller, N., Kuprash, D.V.,
17 Aguzzi, A., Ludewig, B., Nedospasov, S.A. & Zinkernagel, R.M. (2006) Expression
18 of lymphotoxin beta governs immunity at two distinct levels. *European journal of*
19 *immunology* **36**: 2061–2075.
- 20 Kronström, M., Svenson, B., Hellman, M. & Persson, G.R. (2001) Early implant
21 failures in patients treated with Brånemark System titanium dental implants: a
22 retrospective study. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **16**:
23 201-207.
24
- 25 Laytragoon-Lewin, N., Cederblad, L., Andersson, B.Å., Olin, M., Nilsson, M.,
26 Rutqvist, L.E., Lundgren, J., Engström, M., Tytor, W., Löfgren, S. & Lewin, F.
27 (2016) Single-Nucleotide Polymorphisms and Cancer Risk, Tumor Recurrence, or
28 Survival of Head and Neck Cancer Patients. *Oncology* **92**
- 29 Lee, L.G., Connell, C.R. & Bloch, W. (1993) Allelic discrimination by nick-
30 translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research* **21**: 3761-6.

- 1 Leite, M.F., Santos, M.C., de Souza, A.P. & Line, S.R. (2008) Osseointegrated
2 Implant Failure Associated with MMP-1 Promotor Polymorphisms (-1607 and -
3 519). *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 653–658.
- 4 Liao, J., Li, C., Wang, Y., Ten, M., Sun, X., Tian, A., Zhang, Q. & Liang, X. (2014)
5 Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms
6 and dental implant failure. *Molecular biology reports* **41**: 2789–2798.
- 7 Liu, G., Wang, Y. & Wong, L. (2010) FastTagger: an efficient algorithm for
8 genome-wide tag SNP selection using multi-marker linkage disequilibrium. *BMC*
9 *Bioinformatics* **11**: 1-12.
- 10 Liu, Y., Sheng, H., Lu, L., Wu, Z., Chen, Q., Xiao, H. & Jin, W. (2011) Haplotype-
11 based association of four lymphotoxin-alpha gene polymorphisms with the risk of
12 coronary artery disease in Han Chinese. *The Tohoku journal of experimental*
13 *medicine* **224**: 119-125.
- 14
- 15 Liz-Grana, M. & Gomez-Reino Carnota, J.J. (2001) Tumour necrosis factor.
16 Genetics, cell action mechanism and involvement in inflammation. *Journal of*
17 *investigational allergology & clinical immunology* **16**: 140–9.
- 18 Loe, H. (1967) The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index
19 Systems. *Journal of Periodontology* **38**: 610-6.
- 20 Madeleine, M.M., Johnson, L.G., Malkki, M., Resler, A.J., Petersdorf, E.W.,
21 McKnight, B. & Malone, K.E. (2011) Genetic variation in proinflammatory
22 cytokines IL6, IL6R, TNF-region, and TNFRSF1A and risk of breast cancer.
23 *Breast cancer research and treatment* **129**: 887-899.
- 24
- 25 Mahajan, A., Tabassum, R., Chavali, S., Dwivedi, O.P., Chauhan, G., Tandon, N.
26 & Bharadwaj, D. (2010) Obesity-dependent association of TNF-LTA locus with
27 type 2 diabetes in North Indians. *Journal of molecular medicine* **88**: 515-522.
- 28
- 29 Medzhitov, R. (2010) Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*
30 **140**: 771-776.

- 1 Montes, C.C., Alvim-Pereira, F., de Castilhos, B.B., Sakurai, M.L., Olandoski, M. &
2 Trevilatto, P.C. (2009) Analysis of the association of IL1B (Cp3954T) and IL1RN
3 (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clinical*
4 *oral implants research* **20**: 208-217.
- 5 Montes, C.C., Pereira, F.A., Thomé, G., Alves, E.D., Acedo, R.V., de Souza, J.R.,
6 Melo, A.C. & Trevilatto, P.C. (2007) Failing Factors Associated With
7 Osseointegrated Dental Implant Loss. *Implant Dentistry* **16**: 404-412.
- 8 Naert, I., Koutsikakis, G., Duyck, J., Quirynen, M., Jacobs, R. & van Steenberghe,
9 D. (2002) Biologic outcome of implant-supported restorations in the treatment of
10 partial edentulism. part I: a longitudinal clinical evaluation. *Clinical oral implants*
11 *research* **13**: 381-389.
- 12
- 13 Noguerol, B., Muñoz, R., Mesa, F., de Dios Luna, J. & O'Valle, F. (2006) Early
14 implant failure. Prognostic capacity of Periotest: retrospective study of a large
15 sample. *Clinical oral implants research* **17**: 459-464.
- 16 Olmedo-Gaya, M.V., Manzano-Moreno, F.J., Cañaveral-Cavero, E., de Dios
17 Luna-del Castillo, J. & Vallecillo-Capilla, M. (2016) Risk factors associated with
18 early implant failure: A 5-year retrospective clinical study. *The Journal of*
19 *prosthetic dentistry* **115**: 150-155.
- 20 Pankratz, V.S., Vierkant, R.A., O'Byrne, M.M., Ovsyannikova, I.G. & Poland, G.A.
21 (2010) Associations between SNPs in candidate immune-relevant genes and
22 rubella antibody levels: a multigenic assessment. *BMC Immunol* **11**: 1-10.
- 23
- 24 Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M. & Pena,
25 S.D. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National*
26 *Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 177-182.
- 27
- 28 Pedersen, P.H., Lang, N.P. & Muller, F. (2007) What are the longevities of teeth
29 and oral implants? *Clinical oral implants research* **18**: 15-19.
- 30 Pigossi, S.C., Alvim-Pereira, F., Alvim-Pereira, C.C., Trevilatto, P.C. & Scarel-
31 Caminaga, R.M. (2014) Association of Interleukin 4 Gene Polymorphisms With

- 1 Dental Implant Loss. *Implant Dentistry* **23**: 723-731.
- 2 Quirynen, M. & Van Assche, N. (2011) Microbial changes after full-mouth tooth
3 extraction, followed by 2-stage implant placement. *Journal of clinical*
4 *periodontology* **38**: 581-589.
- 5
- 6 Rangel-Zúñiga, O.A., Corina, A., Lucena-Porras, B., Cruz-Teno, C., Gómez-
7 Delgado, F., Jiménez-Lucena, R., Alcalá-Díaz, J.F., Haro-Mariscal, C., Yubero-
8 Serrano, E.M., Delgado-Lista, J., López-Moreno, J., Rodríguez-Cantalejo, F.,
9 Camargo, A., Tinahones, F.J., Ordovás, J.M., López-Miranda, J. & Pérez-
10 Martínez, P. (2016) TNFA gene variants related to the inflammatory status and its
11 association with cellular aging: From the CORDIOPREV study. *Experimental*
12 *gerontology* **83**: 56-62.
- 13 Rojas, J., Fernandez, I., Pastor, J.C., Garcia-Gutierrez, M.T., Sanabria, M.R.,
14 Brion, M., Coco, R.M., Ruiz-Moreno, J.M., Garcia-Arumi, J., Elizalde, J., Ruiz-
15 Miguel, M., Gallardo, J.M., Corrales, R.M. & Carracedo, A. (2010) A strong
16 genetic association between the tumor necrosis factor locus and proliferative
17 vitreoretinopathy: the retina 4 project. *Ophthalmology* **117**: 2417-2423.
- 18
- 19 Roodman, D.G. (1993) Role of Cytokines in the Regulation of Bone Resorption.
20 *Calcified tissue international* **53**: 94-98.
- 21 Santos, M.C., Campos, M.I., Souza, A.P., Trevilatto, P.C. & Line, S.R. (2004)
22 Analysis of MMP-1 and MMP-9 Promoter Polymorphisms in Early
23 Osseointegrated Implant Failure. *The International Journal of Oral & Maxillofacial*
24 *Implants* **19**: 38-43.
- 25 Silness, J. & Loe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation
26 between oral and hygiene and periodontal condition. *Acta odontologica*
27 *Scandinavica* **22**: 121-35.
- 28 Simonis, P., Dufour, T. & Tenenbaum, H. (2010) Long-term implant survival and
29 success: a 10–16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clinical oral*
30 *implants research* **21**: 772-777.

- 1 Takeji, K., Ikeda, S., Arai, T., Tanaka, N., Muramatsu, M. & Sawabe, M. (2008)
2 Lymphotoxin-alpha polymorphisms and presence of cancer in 1,536 consecutive
3 autopsy cases. *BMC Cancer* **8**: 1-12.
- 4 Tani-Ishii, N., Tsunoda, A., Teranaka, T. & Umemoto, T. (1999) Autocrine
5 Regulation of Osteoclast Formation and Bone Resorption by IL-1a and TNF a.
6 *Journal of dental research* **78**: 1617-1623.
- 7 Taylor, J.M., Wicks, K., Vandiedonck, C. & Knight, J.C. (2008) Chromatin profiling
8 across the human tumour necrosis factor gene locus reveals a complex, cell type-
9 specific landscape with novel regulatory elements. *Nucleic acids research* **36**:
10 4845–4862.
- 11 Thorisson, G.A., Smith, A.V., Krishnan, L. & Stein, L.D. (2005) The International
12 HapMap Project Web site. *Genome research* **15**: 1592-3.
- 13 Tracey D, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A
14 comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008; 117: 244-279.
- 15 Tress, M,L. Martelli, P,L. Frankish, A. Reeves, G,A. Wesselink, J,J. Yeats, C.
16 Olason, P,I. Albrecht, M. Hegyi, H. Giorgetti, A. Raimondo, D. Lagarde, J.
17 Laskowski, R,A. López, G. Sadowski, M,I. Watson, J,D. Fariselli, P. Rossi, I.
18 Nagy, A. Kai, W. Storling, Z. Orsini, M. Assenov, Y. Blankenburg, H. Huthmacher,
19 C. Ramírez, F. Schlicker, A. Denoeud, F. Jones, P. Kerrien, S. Orchard, S.
20 Antonarakis, S,E. Reymond, A. Birney, E. Brunak, S. Casadio, R. Guigo, R.
21 Harrow, J. Hermjakob, H. Jones, D,T. Lengauer, T. Orengo, C,A. Patthy, L.
22 Thornton, J,M. Tramontano, A & Valencia, A. (2007) The implications of
23 alternative splicing in the ENCODE protein complement. *Proceedings of the*
24 *National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**: 5495-5500.
25
- 26 Trevisatto, P.C. & Line, S.R. (2000) Use of buccal epithelial cells for pcr
27 amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology*
28 **18**:6-9.
- 29 Van Steenberghe, D., Lekholm, U., Bolender, C., Folmer, T., Henry, P.,
30 Herrmann, I., Higuchi, K., Laney, W., Linden, U. & Astrand, P. (1990) Applicability
31 of osseointegrated oral implants in the rehabilitation of partial edentulism: a

1 prospective multicenter study on 558 fixtures. *The International journal of oral &*
2 *maxillofacial implants* **5**: 272-281.

3 Ware, C.F. (2005) Network Communications: Lymphotoxins, LIGHT, and TNF.
4 *Annual review of immunology* **23**: 787–819.

5 Xie, T., Rowen, L., Aguado, B., Ahearn, M.E., Madan, A., Qin, S., Campbell, R.D.
6 & Hood, L. (2003) Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex
7 Class III Region and Its Comparison to Mouse. *Genome Research* **13**: 2621-2636.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1	Anexos	
2	Lista de abreviaturas e siglas	
3	µl	microlitro
4	DL	Desequilíbrio de Ligação
5	DNA	Ácido Desoxirribonucleico
6	EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
7	et al.	e colaboradores
8	Fig.	Figura
9	IC	Intervalo de Confiança
10	HIV	Vírus da imunodeficiência humana
11	IC	Índice de cálculo
12	IG	Índice gingival
13	IP	Índice de placa
14	LTA	Linfotoxina alfa
15	LTB	Linfotoxina beta
16	M	Molar
17	mM	Milimolar
18	MHC	Complexo principal de
19		histocompatibilidade
20	NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
21		<i>Information</i>
22	OR	Odds Ratio
23	PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
24	PIC	Perda de inserção clínica
25	PS	Profundidade de sondagem
26	rpm	rotações por minuto
27	rs	reference SNP

1	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
2	TNF	Fator de necrose tumoral
3	TNFA	Fator de Necrose Tumoral alfa
4	YRI	Yoruba
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		

1 Parecer do Comitê de Ética

 PUCPR	PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ Núcleo de Bioética Comitê de Ética em Pesquisa <i>Ciência com Consciência</i>
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA	
Parecer Nº 0003772/10	Protocolo CEP Nº 323
Título do projeto Influência de polimorfismos em genes de mediadores inflamatórios na falha de implante dentais	Grupo III
Protocolo CONEP 323	Versão 9
Instituição PUCPR	Pesquisador responsável Paula Cristina Trevilatto
Objetivos	
Analisar a influência de marcadores genéticos relacionados com genes de mediadores inflamatórios, na perda de implantes dentários.	
Comentários e considerações	
Trata-se de solicitação para realização de genotipagem em laboratório canadense (Montreal). A previsão inicial era de que as genotipagens seriam realizadas nos laboratórios da PUCPR, porém como houve uma nova captação de recursos, a pesquisadora decidiu realizar os testes em laboratório que permitirá expandir drasticamente o alcance do projeto. A pesquisadora atesta que não haverá envio de amostras ao exterior e sim o transporte realizado pela própria. Informa também que não se trata de cooperação estrangeira, já que o laboratório canadense apenas prestará serviços sob remuneração, à pesquisadora. Existe também a informação de que não serão compartilhado dados entre os laboratórios envolvidos, bem como as amostras transportadas e seus eventuais resíduos serão trazidas de volta ao país pela própria pesquisadora.	
Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.	
O projeto original não contempla o transporte de amostras para o exterior, mas esta precariedade é suprida pela melhoria da possível beneficência ao sujeito. Não haverá violação do TCLE por se tratar de uma expansão do projeto que mantém os mesmos objetivos e sob responsabilidade total da mesma pesquisadora explicitados no TCLE original.	
Conclusões	
Por solicitação do CEP/PUCPR a pesquisadora: 1. Encaminhou relatório parcial adequado da pesquisa; 2. Acrescentou declarações a) do pesquisador, dando conta do tipo (características detalhadas) do material a ser transportado, condições de embalagem, testes aos quais serão submetidas as amostras, de que levará e trará o material sob sua inteira responsabilidade, além dos dados do laboratório canadense destinatário b) do responsável pelo laboratório destinatário dando conta de que não será considerado, em hipótese alguma, provedor desse material biológico e nem fará a retenção da amostra ou parte dela.	
Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: 09/06/2010 , manifesta-se por considerar o projeto Aprovado .	
Situação Aprovado	
Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.	
Curitiba, 09 de Junho de 2010.	
Prof. MSc. Nair Akel Filho Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa PUCPR	

