



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ALESSANDRA MANCHINI CARDOSO TARALLO

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO E DA TERAPIA ANTI-HIPERTENSIVA
SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO: uma avaliação clínica e molecular**

2019

ALESSANDRA MANCHINI CARDOSO TARALLO

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO E DA TERAPIA ANTI-HIPERTENSIVA SOBRE O
METABOLISMO ÓSSEO: uma avaliação clínica e molecular**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos clínicos e laboratoriais de materiais e técnicas endodônticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Camila Porto de Deco

Universidade do Vale do Paraíba (Unesp)

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Luciana Sassa Marocchio dos Santos

Universidade Nove de Julho (Uninove)

Campus de São Paulo

Prof. Titular Renato Sussumu Nishioka

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Associada Ana Paula Martins Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 22 de novembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: aos meus pais, Ervino da Paz Cardoso e Sonia Aparecida Manchini, pela formação humana, amor, incentivo e apoio incondicional. Ao meu marido, Fernando Lopes Tarallo, que pacientemente compreendeu minha ausência e minha dedicação à minha formação acadêmica; agradeço por cada palavra de incentivo e pelo companheirismo rotineiro. Aos meus irmãos, Renata Manchini Cardoso e Gustavo Benck Cardoso, pela alegria e leveza de cada momento compartilhado. Sou muito agradecida e não conseguiria andar tanto sem o apoio de vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus sogros, Dorival João Tarallo e Mara Lopes Tarallo, agradeço pelo apoio e incentivo durante essa etapa.

Aos meus queridos amigos, Felipe de Souza Matos e Laís Landim, pela parceria e cumplicidade; vocês foram fundamentais para a conclusão dessa fase.

Aos demais amigos e colegas da pós-graduação da UNESP, pela troca de experiências e aprendizado; pela amizade, motivação e momentos de descontração durante essa jornada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Renata Falchete do Prado, que me acolheu num período turbulento mas com a sua positividade e determinação me fez acreditar e me incentivar; dotada de um pensamento rápido e objetivo, é uma referência a ser seguida.

Aos docentes da área de Endodontia, pelos ensinamentos que me foram concedidos. Em especial, a Profa Associada Ana Paula Martins Gomes, agradeço pelos conhecimentos e por ser uma inspiração pois além de ser uma excelente endodontista e professora, é uma pessoa simples e sempre disposta a ajudar.

Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca, Profa Dra Camila Porto de Deco, Profa. Dra Luciana Sassa Marocchio dos Santos e Prof. Titular Renato Sussumu Nishioka, muito obrigada por fazerem parte desse momento importante e acredito que agregarão muito ao meu trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, pela disposição em sempre ajudar e compartilhar seus conhecimentos em estatística, além de experiência clínica e científica.

A todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, seu corpo docente, direção e administração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa.

*"Pesquisa para constatar, constatando,
intervenho, intervindo educo e me educo.
Pesquisa para conhecer o que ainda não
conheço e comunicar ou anunciar a novidade."*

Paulo Freire

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 ARTIGO.....	12
2.1 Artigo – do Prado RF, Tarallo AMC, Vasconcellos LMR, Silva AM, Nogueira Junior L, Saavedra GSFA, Nishioka RS, Borges ALS. Correlações dos achados clínicos e moleculares em pacientes submetidos à cirurgia de implante dentário / <i>Clinical and Molecular findings correlations in patients under dental implant surgery</i>	12
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	42
3.1 Considerações metodológicas.....	42
3.2 Considerações sobre os resultados.....	45
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS	53

Tarallo AMC. Influência do tabagismo e da terapia anti-hipertensiva sobre o metabolismo ósseo: uma avaliação clínica e molecular [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Fatores locais e sistêmicos podem interferir no processo de osseointegração porém a susceptibilidade genética à falha do implante osseointegrado permanece desconhecida. Portanto, é de grande interesse realizar uma análise epidemiológica para avaliação da expressão gênica de alguns marcadores moleculares da inflamação e do metabolismo ósseo e correlacioná-los com tabagismo e terapia anti-hipertensão na população submetida à cirurgia de implante dentário, atendida no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos em 2017 e 2018. Foram obtidas 39 amostras ósseas durante a cirurgia de implante, utilizando-se sugador cirúrgico com coletor par osso de 32 pacientes. As reações em cadeia do polimerase em tempo real (RT-PCR) foram executadas para avaliar os genes: fosfatase alcalina (ALP), apolipoproteína, beta Actina, proteína morfogenética II, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, interleucina 6, integrina $\beta 1$, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), osteocalcina, osteonectina, osteopontina, osterix, prostaglandina E2 sintase (PGE2), fator de transcrição relacionado ao Runx 2 (RUNX2) e fator de crescimento transformador beta (TFG- β). Os dados clínicos foram tabulados para caracterização demográfica. A análise estatística utilizando o teste de Mann-Whitney foi realizada com 5% de significância. Como resultados, 17 pacientes foram incluídos no grupo controle, 6 pacientes apresentavam terapia anti-hipertensiva, 3 pacientes fumavam cigarros e 3 pacientes utilizavam terapia anti-hipertensiva e fumavam cigarros e 3 pacientes fumaram cigarros durante pelo menos 10 anos e pararam pelo menos 5 anos atrás. A análise dos dados demonstrou redução dos genes no grupo da terapia anti-hipertensiva, com diferença significativa para RUNX2 e interleucina 6, quando comparado ao grupo controle. No grupo de pacientes fumantes, a transcrição da integrina foi significativamente maior. Os marcadores de diferenciação óssea foram mais expressos no grupo controle, mas sem diferença significativa quando comparados ao grupo fumante.

Palavras-chave: Osseointegração. Tabagismo. Marcadores moleculares. Terapia anti-hipertensiva. Ex-fumantes.

Tarallo AMC. Influence of smoking and hypertensive therapy on bone metabolism: a clinical and molecular evaluation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Local and systemic factors may interfere in the osseointegration process but genetic susceptibility to osseointegrated implant failure remains unknown. The objective of this research was to perform an epidemiological analysis in which a convenience sample was used to evaluate the gene expression of some molecular markers of inflammation and bone metabolism and to correlate them with smoking and anti-hypertensive therapy in the population underwent dental implant surgery, attended at the São José dos Campos Institute of Science and Technology in 2017 and 2018. Thirty-nine bone samples were obtained during implant surgery, using surgical suction with collector from thirty-two patients. Real time Polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed for evaluate the genes: alkaline phosphatase (ALP), apolipoprotein, beta actin, bone morphogenetic protein II (BMP II), bone sialoprotein (BSP), type I Collagen, interleukin 6, integrin β 1, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), osteocalcin, osteonectin, osteopontin, osterix, prostaglandin E2 synthase (PGE2), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transforming growth factor beta (TGF- β). Clinical data were tabulated for demographic characterization. Statistical analysis using Mann-Whitney tests was performed at 5% of significance. As results, 17 patients were include in control group, 6 patients under antihypertensive therapy, 3 patients smoke cigarettes and 3 patients under antihypertensive therapy and smoke cigarettes and three patients smoked cigarettes during at least for 10 years and stop at least 5 fives ago. The follow up of prosthetic rehabilitation and implant success will be explored in another research. Data analysis demonstrated downregulation of the genes in the hypertensive group, with significant difference for RUNX2 and Interleukin 6, when compared to the control group. In the group of smoking patients, the integrin transcript was significantly higher. Bone differentiation markers were more expressed in the control group, but without significant difference when compared to the smoker group.

Keywords: Osseointegration. Smoking. Molecular marker. Antihypertensive therapy. Former smokers.

1 INTRODUÇÃO

Com o advento da implantodontia, a utilização dos implantes osseointegrados como parte do planejamento nas reabilitações orais possibilitou a realização de uma reabilitação mais satisfatória aos pacientes. Sua eficácia como método terapêutico, associada a protocolos cirúrgicos e protéticos apropriados, vem sendo constatada na literatura demonstrando índices de sucesso satisfatórios, apresentando, em média 94,4% de taxa de sucesso, podendo variar de 76,0% a 98,7% (Mavrogenis, 2009).

A osseointegração, que pode ser definida como uma conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo vivo e a superfície de um implante submetido à carga funcional, foi observada em 1956 pela primeira vez, quando Per-Ingvar Brånemark (ortopedista sueco) percebeu em um estudo da circulação sanguínea de coelhos, que as câmaras de titânio que ele usava em seus experimentos ficavam presas às tíbias dos animais. Mais tarde, com longo e minucioso trabalho de pesquisa, o autor demonstrou como o tecido ósseo aceitava e incorporava peças de titânio sem reações adversas (Brånemark et al., 1977).

Alguns fatores locais e sistêmicos podem influenciar na osseointegração, assim faz-se necessário identificá-los para que o profissional clínico possa estar atento a um planejamento mais adequado com menores riscos de falhas, evitando complicações e morbidades ao paciente (Hartmann et al., 2017).

O tabagismo apresenta forte associação tanto com a severidade da doença periodontal quanto com a perda óssea peri-implantar. Em um cigarro estão presentes mais de 4.000 toxinas. Estas incluem monóxido de carbono, substâncias cancerígenas (nitrosaminas) e substâncias psicoativas como a nicotina, que é considerada a substância farmacologicamente mais ativa e passível de ser absorvida pela mucosa oral (Chen, 2016).

Constata-se na literatura resultados desfavoráveis dos implantes em pacientes fumantes sendo estes atribuídos às alterações do sistema imunológico e da cicatrização. Observa-se que o tabaco proporciona efeitos citotóxicos na função dos fibroblastos (adesão e proliferação), interfere na quimiotaxia e na fagocitose dos neutrófilos, e influencia negativamente os linfócitos na produção de imunoglobulina. Além disso, relatou-se que o fumo aumenta os níveis de carboxihemoglobina, fibrinogênio e hemoglobina, o que resulta em uma alteração na integridade e no remodelamento do tecido conjuntivo e, assim, prejudica a cicatrização e a resposta do hospedeiro diante de uma agressão (Esposito et al., 1998).

A hipertensão arterial é um importante fator de risco para a morte prematura em todo o mundo, principalmente por causar complicações cardiovasculares. Indivíduos hipertensos apresentam metabolismo anormal de cálcio resultando em concentrações inferiores desse mineral, de vitamina D, magnésio e altas concentrações de hormônio da paratireoide (PTH), prejudicando a qualidade e a densidade do tecido ósseo (Tibazarwa, Damasceno, 2014).

Foi constatado importante avaliar a qualidade do tecido ósseo em pacientes hipertensos, em uso de terapia anti-hipertensiva, visando prever a capacidade de formação óssea em situações como a osseointegração após a instalação de implantes (Mulinari-Santos et al., 2018).

A quantificação relativa da expressão de mRNA pela transcrição reversa em real tempo da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR) transformou-se em um importante método de escolha para estudos da expressão de genes em vários organismos (Thellin et al., 2009). Estudos como o de Slotte et al. (2012) que propuseram uma metodologia como ferramenta de diagnóstico não-invasiva para o monitoramento de genes específicos da reparação óssea e avaliação do tecido peri-implante, complementando as avaliações clínicas e Hartmann et al. (2017) conduziram estudo molecular avaliando marcadores ósseos no processo de perda de próteses por afrouxamento asséptico, ambos utilizaram a RT-PCR como método para análise da expressão gênica.

A susceptibilidade genética à falha do implante osseointegrado permanece desconhecida. Portanto, julgamos de grande interesse realizar uma análise epidemiológica na qual uma amostra de conveniência serviu para avaliar a

expressão gênica de alguns marcadores moleculares da inflamação e do metabolismo ósseo em pacientes que receberam implantes dentários. Objetivou-se também correlacionar a expressão gênica com o tabagismo e a terapia anti-hipertensiva na população atendida no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos em 2017 e 2018.

2 ARTIGO

2.1 Artigo – do Prado RF, Tarallo AMC, Vasconcellos LMR, Silva AM, Nogueira Junior L, Saavedra GSFA, Nishioka RS, Borges ALS. Correlações dos achados clínicos e moleculares em pacientes submetidos à cirurgia de implante dentário / *Clinical and Molecular findings correlations in patients under dental implant surgery**

RESUMO

Fatores locais e sistêmicos podem interferir no processo de osseointegração porém a susceptibilidade genética à falha do implante osseointegrado permanece desconhecida. Portanto, é de grande interesse realizar uma análise epidemiológica para avaliação da expressão gênica de alguns marcadores moleculares da inflamação e do metabolismo ósseo e correlacioná-los com tabagismo e terapia anti-hipertensiva na população submetida à cirurgia de implante dentário, atendida no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos em 2017 e 2018. Foram obtidas 39 amostras ósseas durante a cirurgia de implante, utilizando-se sugador cirúrgico com coletor para osso de 32 pacientes. As reações em cadeia do polimerase em tempo real (RT-PCR) foram executadas para avaliar os genes: fosfatase alcalina (ALP), apolipoproteína, beta Actina, proteína morfogenética II, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, interleucina 6, integrina $\beta 1$, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), osteocalcina, osteonectina, osteopontina, osterix, prostaglandina E2 sintase (PGE2), fator de transcrição relacionado ao Runx 2 (RUNX2) e fator de crescimento transformador beta (TFG- β). Os dados clínicos foram tabulados para caracterização demográfica. A análise estatística utilizando o teste de Mann-Whitney foi realizada com 5% de significância. Como resultados, 17 pacientes foram incluídos no grupo controle, 6 pacientes utilizavam terapia anti-hipertensiva, 3 pacientes fumavam cigarros e 3 pacientes com terapia anti-hipertensiva e fumavam cigarros e 3 pacientes fumaram cigarros durante pelo menos 10 anos e pararam pelo menos 5 anos atrás. A análise dos dados demonstrou redução dos genes no grupo da terapia anti-hipertensiva, com diferença significativa para RUNX2 e interleucina 6, quando comparado ao grupo controle. No grupo de pacientes fumantes, a transcrição da integrina foi significativamente maior. Os marcadores de diferenciação óssea foram mais expressos no grupo controle, mas sem diferença significativa quando comparados ao grupo fumante. Apesar de todos os resultados significativos aqui apresentados, assumimos que as repetições em outras populações são obrigatórias para melhor elucidar o papel desses genes na influência da suscetibilidade individual à perda do implante dentário. No futuro, a

* Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Clinical Oral Implants Research* (Online ISSN:1600-0501). Submetido em: 10/09/2019.

terapêutica individual poderia ser desenvolvida, aumentando as taxas de sucesso do implante.

Palavras-chave: Osseointegração. Tabagismo. Marcadores moleculares. Terapia anti-hipertensiva. Ex-fumantes.

ABSTRACT

To perform an epidemiological analysis in which a convenience sample was used to evaluate the gene expression of some molecular markers of inflammation and bone metabolism and to correlate them with smoking and hypertension in the population underwent dental implant surgery, attended at the São José dos Campos Institute of Science and Technology in 2017 and 2018. METHODS: 39 bone samples were obtained during implant surgery, using surgical suction with collector from 32 patients. Real time Polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed for evaluate the genes: alkaline phosphatase (ALP), apolipoprotein, beta actin, bone morphogenetic protein II (BMP II), bone sialoprotein (BSP), type I Collagen, interleukin 6, integrin β 1, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), osteocalcin, osteonectin, osteopontin, osterix, prostaglandin E2 synthase (PGE2), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transforming growth factor beta (TFG- β). Clinical data were tabulated for demographic characterization. Statistical analysis using Mann-Whitney tests was performed at 5% of significance. As results, 17 patients were include in control group, six patients presented hypertension, three patients smoke cigarettes and three patients presented hypertension and smoke cigarettes and three patients smoked cigarettes during at least for 10 years and stop at least 5 fives ago. The follow up of prosthetic rehabilitation and implant success will be explored in another research. Data analysis demonstrated downregulation of the genes in the hypertensive group, with significant difference for RUNX2 and Interleukin 6, when compared to the control group. In the group of smoking patients, the integrin transcript was significantly higher. Bone differentiation markers were more expressed in the control group, but without significant difference when compared to the smoker group. Despite all significant results presented herein, we assume that replications in other populations are mandatory to better elucidate the role of this genes in influencing individual susceptibility to dental implant loss. In the future, individual therapeutics could be developed, increasing the implant success rates.

Keywords: Osseointegration. Smoking. Molecular marker. Antihypertensive therapy. Former smokers.

Introduction

Although dental implants have a high success rate, failures occur, despite adequate clinical conditions. The percentage of implant loss of around 2.5 and 6.5% is relevant due to the greater number of dental implant treatment.¹ Observation of

multiple implant loss in certain groups of individuals (clustering phenomenon) suggests that host response may influence implant failure^{2,3}. The challenge for the future in the treatment with osseointegrated implants will be the professional ability to detect and classify risk³.

Becker et al. revealed statistically significant influences of the tobacco smoking on long-term implant survival rate, demonstrating that 57.14% of smokers lost at least one of the implants in the study, comparing with 16.9% of non-smokers who lost at least one of the implants⁴. The pooled analysis indicated a significant increased risk of implant failure in smokers in the study of Chambrone et al. 2014⁵.

Many papers have reported molecular patterns of bone in cases of implant loss, however, after it happened^{2,6-10}. We propose to evaluate the bone previously to the implant placement, since the condition of tobacco smoke increase risk of implant failure^{4,5}. We decide to find a molecular pattern in these patients which may justify this risk.

The development of polymerase chain reaction (PCR) has generated vast benefits in genetic analysis for the study of gene expression. PCR plays an important role in various fields of dentistry. For example, genetic analysis using PCR for identification of susceptibility to periodontitis will help to determine the type and frequency of treatment. Studies based on PCR analyzing various immune and inflammatory markers are useful in understanding the pathogenesis of periodontitis¹¹. Besides that, samples from oral tumors, subgingival plaque, saliva, blood, gingival tissue, and buccal mucosa scraping were tested using PCR technique to identify microorganisms, genetic polymorphisms, and quantify mRNA expression. Other important application of PCR was its use as a diagnostic tool in peri-implantitis, either previously to implant surgery, detecting bacteria, identifying risk of peri-implantitis development¹¹.

Genetic susceptibility to osseointegrated implant failure remains unknown¹². So we design this research to perform an epidemiological analysis in which a convenience sample served to evaluate the gene expression of some molecular markers of inflammation and bone metabolism in patients receiving dental implants. We also aimed to correlate gene expression with smoking and hypertension in the population attended at the São José dos Campos Institute of Science and

Technology in 2017 and 2018. We aimed the definition of some potential genetic targets related to implant loss, and increase the implant success rates in the future.

Methods

The research protocol was approved by the Human Research Ethics Committee (n. 2.538.469). Patients were selected according to the inclusion and exclusion criteria below. To sign the informed consent was prerequisite to participation.

Inclusion criteria were accept informed consent; show up at the ICT prosthesis clinic and require 1 to 4 implants; age between 18 and 70 years old; agree to CT scan; be eligible for implant reception and to accept rehabilitation planning.

Exclusion or non-inclusion criteria were patient's wish to be excluded from research; presence of contraindication for dental implant rehabilitation surgery; bone grafting in the last 12 months; history of Head and Neck Chemotherapy and / or radiotherapy in the last 5 years and severe discrepancies of maxillo-mandibular space.

A complete anamnesis collecting data related to current systemic health was detailed in institutional records. Family and medical history, use of medications and addictions and habits were meticulously explored and tabulated.

The team of implant dentists used their expertise to carry out rehabilitation planning. Complete treatment began with implant surgery, and continued with healing time of approximately 4 months, implant exposure, prosthetic molding and finally prosthetic rehabilitation. Each case had its individuality preserved, regarding surgical maneuvers and materials used, which were determined by each implant dentist of the team.

As soon as the patient agreed with the rehabilitation planning, each patient was submitted to Cone beam computed tomography (CBCT) using i-CAT scanner (Imaging Sciences, Hatfield, PA, USA) with the following acquisition parameters: 120 kVp, 10 mA, reconstructed voxel size of 0.25 mm, and a field of view (FOV) of 8 × 16 cm. CBCT images were taken for evaluation of implant placement.

Bone sample collection was performed during implant surgery. Chlorhexidine antiseptis was executed, the patient was anesthetized with local anesthetic technique; the incision and a full thickness flap release were performed. As soon as the implant recipient bed was prepared, a surgical bone collector suction system was

used and the perforation was performed under constant irrigation with sterile pyrogen-free saline.

At the end of the perforation, the bone collector was uncoupled from the suction system and a sterile spatula 7 was used for sample collection, which was immediately placed in a free RNase and DNase microcentrifuge tube containing 1mL of TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific California, USA). After sample collection, they were stored at -80°C . The sequence of treatment was conducted underneath expertise of implant dentist. The follow up of prosthetic rehabilitation and implant success will be explored opportunely in another research.

Posteriorly, RNA extraction was performed as follow. Samples were incubated for 5 minutes in ultrasound to lyse, homogenize tissues and permit complete dissociation of the nucleoproteins complex. 0.2 mL of chloroform per 1 mL of TRIzol™ Reagent used for lysis was added, than incubated for 2 minutes. Samples were centrifuged for 15 minutes at 4°C ($12,000 \times g$). The aqueous phase containing the RNA was transferred to a new tube and 0.5 mL of isopropanol was added to the aqueous phase. Samples were incubated at room temperature for 10 min. and centrifuged for 10 minutes at 4°C ($12,000 \times g$). The pellet at the bottom of the tube was washed after discard supernatant. Ethanol at 75% (1mL) was used to wash the RNA pellet which was centrifuged for 5 minutes at 4°C ($7500 \times g$). Once more supernatant was discarded and RNA pellet dry and resuspended in 20uL of DPEC water.

RNA quantities and purities were obtained using spectrophotometer Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. — Wilmington, DE 19810, USA).

To perform cDNA synthesis, using SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix Invitrogen Life Technologies Corporation California, USA), the following solutions were combined in a 0.2mL, thin-walled PCR tube on ice: 400ng of total RNA, 1μL of 50 ng/μL random hexamers, 1 μL of annealing buffer and RNase/DNase-free water to complete 8 μL. Tubes were incubate in a thermal cycler at 65°C for 5 minutes, then immediately place on ice for 1 minute. Still on ice, the reagents: 2X First-Strand Reaction Mix (10 μL) and SuperScript™ III/RNaseOUT™ Enzyme Mix (2 μL) were added, mixed and incubated during 5 minutes at 25°C , followed by 50 minutes at 50°C . Reactions terminated at 85°C for 5 min. and tubes containing samples were stored at -20°C .

RT-PCR were performed with system Step one Plus 7000 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems California, USA), using Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen Life Technologies Corporation California, USA) and specific primers. Previously validated primers sequences may be consulted elsewhere^{13,14}.

Reactions were prepared in 96 well plates, each well containing 12.5 μ L of Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG, 0,5 μ L of forward primer (10 μ M), 0,5 μ L of reverse primer (10 μ M), 0,5 μ L of ROX dye (2,5 μ M), 9 μ L of RNase/DNase-free water and 2 μ L of cDNA template.

RT-PCR were performed as follow: cycle at 50°C for 2 minutes hold (UDG incubation), one cycle at 95°C for 2 minutes hold, 40 cycles at 95°C, during 15 seconds and 60°C during 30 seconds and finally the melting curve analysis. The RT-PCR reactions were performed in duplicate.

After the RT-PCR reactions, the Ct values were used for relative quantification. The Comparative CT Method ($\Delta\Delta$ CT Method)¹⁵ was performed to compare gene expression among the patients. A young male health donor was considered the calibrator. Three genes were tested to choose the normalizer gene: Beta Actin, Type I Collagen and Bone Morphogenetic Protein using NormFinder software (MOMA – Department of Molecular Medicine Aarhus University Hospital Denmark).

Statistical analysis

Sample normality was tested using the Shapiro-Wilk normality test. According to the results, the Mann Whitney test was applied to each gene, comparing groups of patients at significant level of 0.05. The software GraphPad Prism 6® was used to perform statistical analysis and to create comparative graphs. Two groups were compared in each statistical test: Control group x Hypertensive group; Control group x Smoker group; Control group x Smoker and Hypertensive group; and Control Smoker x ex-Smoker group

This work followed the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting.

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of cross-sectional studies

	Item No	Recommendation	Page number
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	3
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	5
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	6
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	6
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	6
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	6
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	Exposed and non exposed 8
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	7
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	12
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	9

		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	9
		(c) Explain how missing data were addressed	9
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	No applicable
		(e) Describe any sensitivity analyses	Not apply
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	9 and 10
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	9 and 10
		(c) Consider use of a flow diagram	Not apply
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	Table 1
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	Not apply
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	Exposed and no exposed 10
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	Not applied
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	Not applied
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	Not applied
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	9
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study	10 and 11 and figures

objectives			
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	13
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	15-18
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	18
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	1

**Give information separately for exposed and unexposed groups.*

Note: An *Explanation and Elaboration* article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Results

Clinical Analysis

We collected samples from 40 patients, however, molecular analysis determine the exclusion of 8 patients. Among the last 32 patients, 10 were male and 22 were female. Mean age was 50 years with standard deviation of 15.8 (ranging 19 to 78). Five patients presented two or more implants and each implant was used as a different sample. 7.7% of surgeries were performed in anterior region and 38.5% in posterior region of maxilla. 5.1% of implants were placed in anterior and 48.7% in posterior mandible. Table 1 presents demographic aspects of patients and the group to which they belong. The follow up of oral rehabilitation success will be explored elsewhere.

Table 1: Demographic data

Record	Gender	Age	Region	Group	Drug(s)
49288	m	71	posterior maxilla	Hypertensive	Potassium Losartan 50mg/ Hydrochlorothiazide 25mg
41376	f	59	posterior maxilla	Hypertensive	Losartan 50mg
47139	m	64	posterior maxilla	Hypertensive	perindopril 4mg/ indapamide 1,25mg
57124	f	53	posterior maxilla	Hypertensive	Nifedipine 20mg
56282	m	54	posterior maxilla	Hypertensive	enalapril maleate 10mg
56206	f	55	posterior mandible	Hypertensive	
46735	f	78	anterior mandible	Hypertensive and Smoker	Nifedipine 10mg
52969	f	62	posterior mandible	Hypertensive and Smoker	Captopril 25mg
52969	f	62	posterior mandible	Hypertensive and Smoker	Captopril 25mg
52969	f	38	posterior mandible	Hypertensive and Smoker	Captopril 25mg
56696	f	45	posterior maxilla	Hypertensive and Smoker	Losartan 50mg /Atenolol 25mg
45119	m	67	posterior maxilla	Ex-Smoker	
58353	f	64	posterior mandible	Ex-Smoker	
59713	m	65	posterior mandible	Ex-Smoker	
59713	m	65	posterior mandible	Ex-Smoker	
56860	m	27	anterior maxilla	Smoker	
41519	f	41	posterior maxilla	Smoker	
58234	f	35	posterior maxilla	Smoker	
48590	f	45	posterior maxilla	Control	
48756	f	63	posterior maxilla	Control	
55208	f	19	anterior mandible	Control	
24032	m	41	posterior mandible	Control	
27492	m	22	anterior maxilla	Control	
50792	f	54	posterior maxilla	Control	
44640	f	67	posterior mandible	Control	
55418	f	31	posterior maxilla	Control	
59001	f	50	anterior maxilla	Control	
58255	m	42	posterior mandible	Control	
56112	f	71	posterior mandible	Control	
56112	f	71	posterior mandible	Control	
58316	f	52	posterior mandible	Control	
58316	f	52	posterior maxilla	Control	
58132	m	27	posterior mandible	Control	
36678	f	38	posterior mandible	Control	
56944	f	35	posterior mandible	Control	
14498	f	69	posterior mandible	Control	

14498	f	69	posterior mandible	Control	
14498	f	69	posterior mandible	Control	
58150	f	53	posterior mandible	Control	

According mainly relevant clinical condition, five groups of patients were formed. Control group demonstrated none relevant clinical condition; hypertensive group was formed by patients under anti-hypertensive drug therapy; smoker group containing patients that assumed to smoke cigarettes daily and hypertensive smoker group with patients summing the blood hypertension under therapy and smoking. The last group Ex-smoker group was composed of patients that stopped smoking at least 5 years ago.

Molecular Analysis

During surgery, despite meticulous care in irrigation to avoid bone warming, the authors assume that RNA integrity was influenced, since best quality obtained during sample collection, evaluated using 260/280 ratio, was 1.88. Less quality sample were also added, since we consider that housekeeping in each sample will normalize the result and we did not find another way to obtain higher quality samples from human bone applying our method design with our objectives.

Collagen I was selected as preferred housekeeping gene using NormFinder software. After use Ct values to relative quantification, groups of patients were compared using non parametric Mann-Whitney test. Results are summarized in Table 2 and figures 1 to 7.

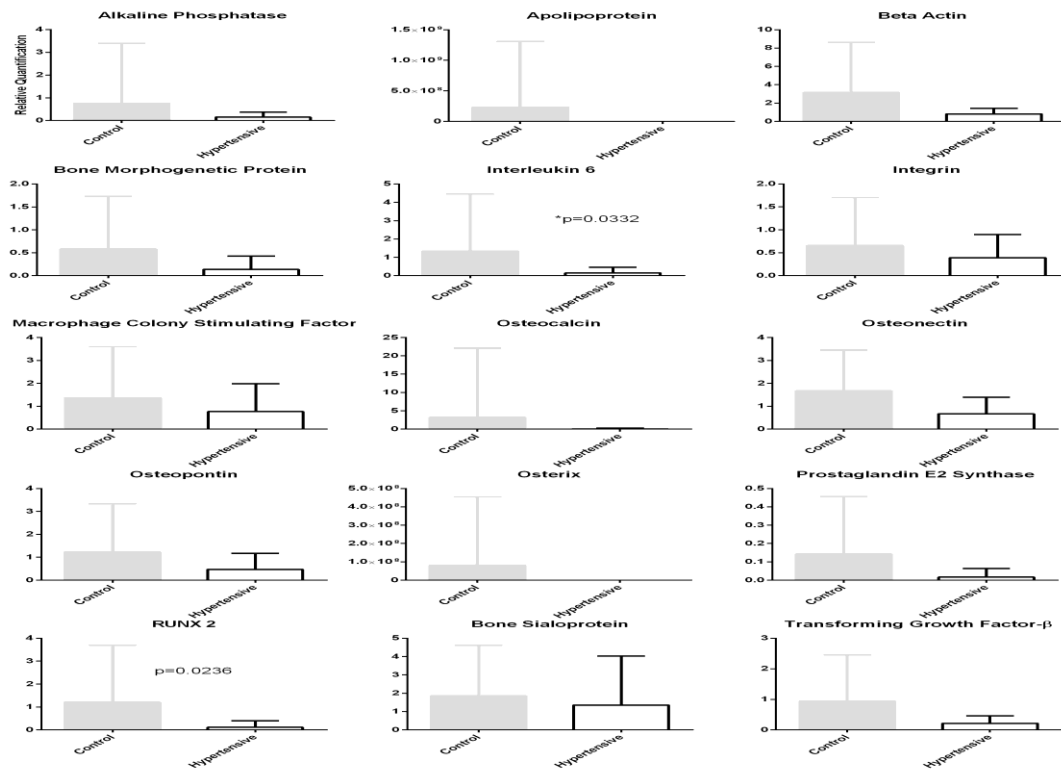
Table2- Statistical analysis of the compared groups of patients

Mann Whitney test	Group	x	Group	P value
GENE				
ALP	Control	x	Hypertensive	p=0,5053
ALP	Control	x	Smoker	p=0,2038
ALP	Control	x	Hypertensive and Smoker	p=0,1590
ALP	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,5052
Apolipoprotein	Control	x	Hypertensive	p=> 0,9999
Apolipoprotein	Control	x	Smoker	p=0,3363
Apolipoprotein	Control	x	Hypertensive and Smoker	p=> 0,9999

Apolipoprotein	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,6923
Beta-actin	Control	x	Hypertensive	p=0,6435
Beta-actin	Control	x	Smoker	p=0,0578
Beta-actin	Control	x	Hypertensive and Smoker	p=0,5592
Beta-actin	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,4715
BMPII	Control	x	Hypertensive	p=0,9241
BMPII	Control	x	Smoker	p=0,3303
BMPII	Control	x	Hypertensive and Smoker	p=0,5621
BMPII	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,1352
BSP	Control	x	Hypertensive	p= 0,3278
BSP	Control	x	Smoker	p= 0,5484
BSP	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,8975
BSP	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,3317
Interleukin 6	Control	x	Hypertensive	p=0,0332*
Interleukin 6	Control	x	Smoker	p=0,7194
Interleukin 6	Control	x	Hypertensive and Smoker	p=0,4239
Interleukin 6	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,0283*
Integrin β 1	Control	x	Hypertensive	p=0,6748
Integrin β 1	Control	x	Smoker	p= 0,0109*
Integrin β 1	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,1230
Integrin β 1	Smoker	x	Ex-Smoker	p=0,4103
MCSF	Control	x	Hypertensive	p= 0,5760
MCSF	Control	x	Smoker	p= 0,3596
MCSF	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,3299
MCSF	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,7193
Osteocalcin	Control	x	Hypertensive	p= 0,1592
Osteocalcin	Control	x	Smoker	p= 0,9635
Osteocalcin	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,7734
Osteocalcin	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,0806

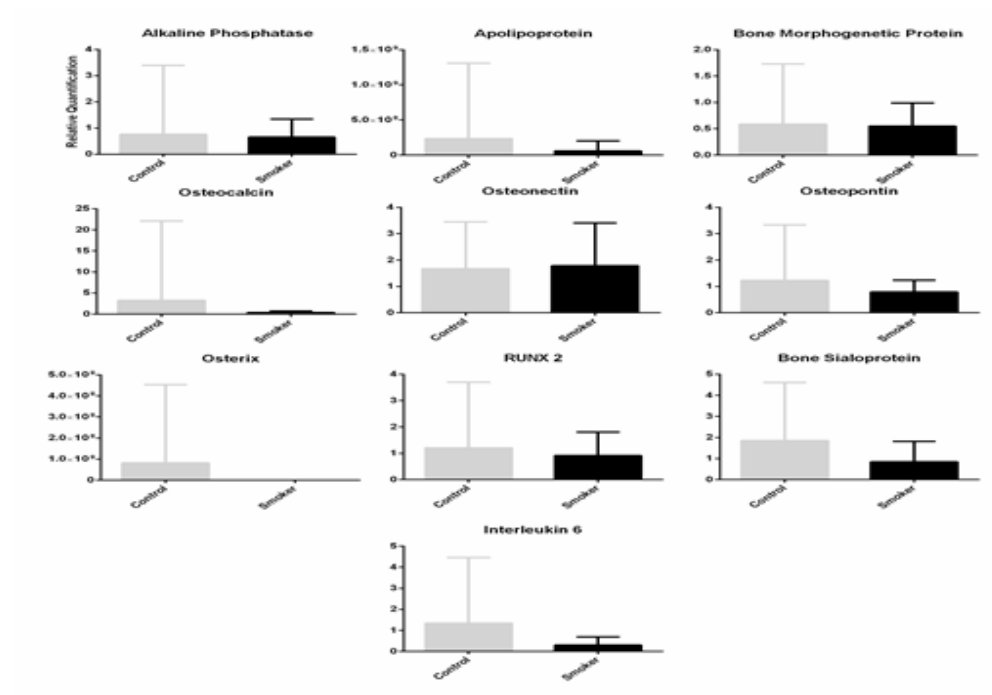
Osteonectin	Control	x	Hypertensive	p= 0,1470
Osteonectin	Control	x	Smoker	p= 0,7483
Osteonectin	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,4785
Osteonectin	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,9820
Osteopontin	Control	x	Hypertensive	p= 0,5472
Osteopontin	Control	x	Smoker	p= 0,4680
Osteopontin	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,3608
Osteopontin	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,0806
Osterix	Control	x	Hypertensive	p= > 0,9999
Osterix	Control	x	Smoker	p= > 0,9999
Osterix	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= > 0,9999
Osterix	Smoker	x	Ex-Smoker	p= > 0,9999
PGE2 Synthase	Control	x	Hypertensive	p= 0,2466
PGE2 Synthase	Control	x	Smoker	p= 0,2622
PGE2 Synthase	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,0647
PGE2 Synthase	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,8315
RUNX2	Control	x	Hypertensive	p= 0,0236*
RUNX2	Control	x	Smoker	p= 0,5635
RUNX2	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,5674
RUNX2	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,2171
TFG-β	Control	x	Hypertensive	p= 0,4268
TFG-β	Control	x	Smoker	p= 0,1412
TFG-β	Control	x	Hypertensive and Smoker	p= 0,5212
TFG-β	Smoker	x	Ex-Smoker	p= 0,0992

Figure 1 Comparisons between Control and Hypertensive



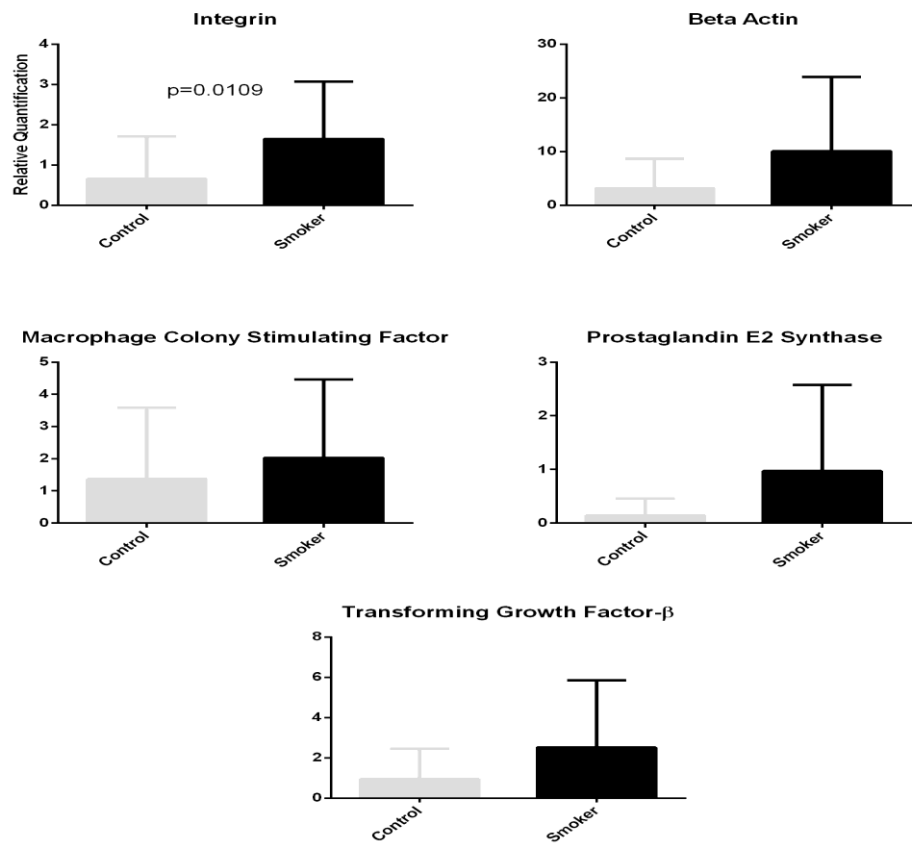
Legend: graphics comparing the expression of each interest gene in control group and hypertensive group. Without exceptions, all genes were under expressed in group of hypertensive patients. Significant differences were verified in Interleukin 6 and RUNX 2 transcripts. P values may be observed in table 2

Figure 2 - Comparisons between Control and Smoker group



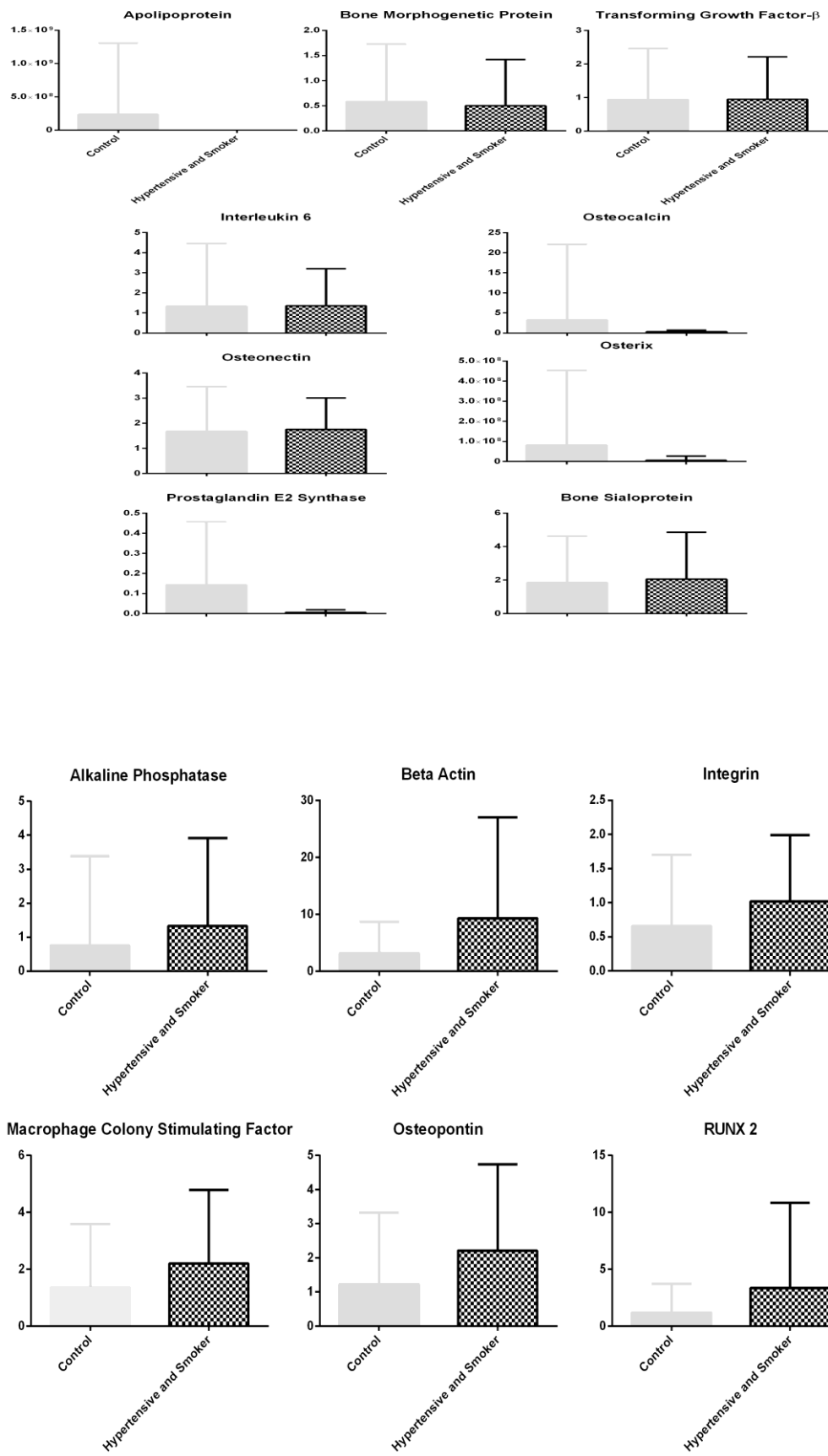
Legend: presents the transcripts that were demonstrated overexpressed in control group when compared to Smoker group. None of these comparisons present significant differences

Figure 3 - cluster of genes presenting higher expression in Smoker group



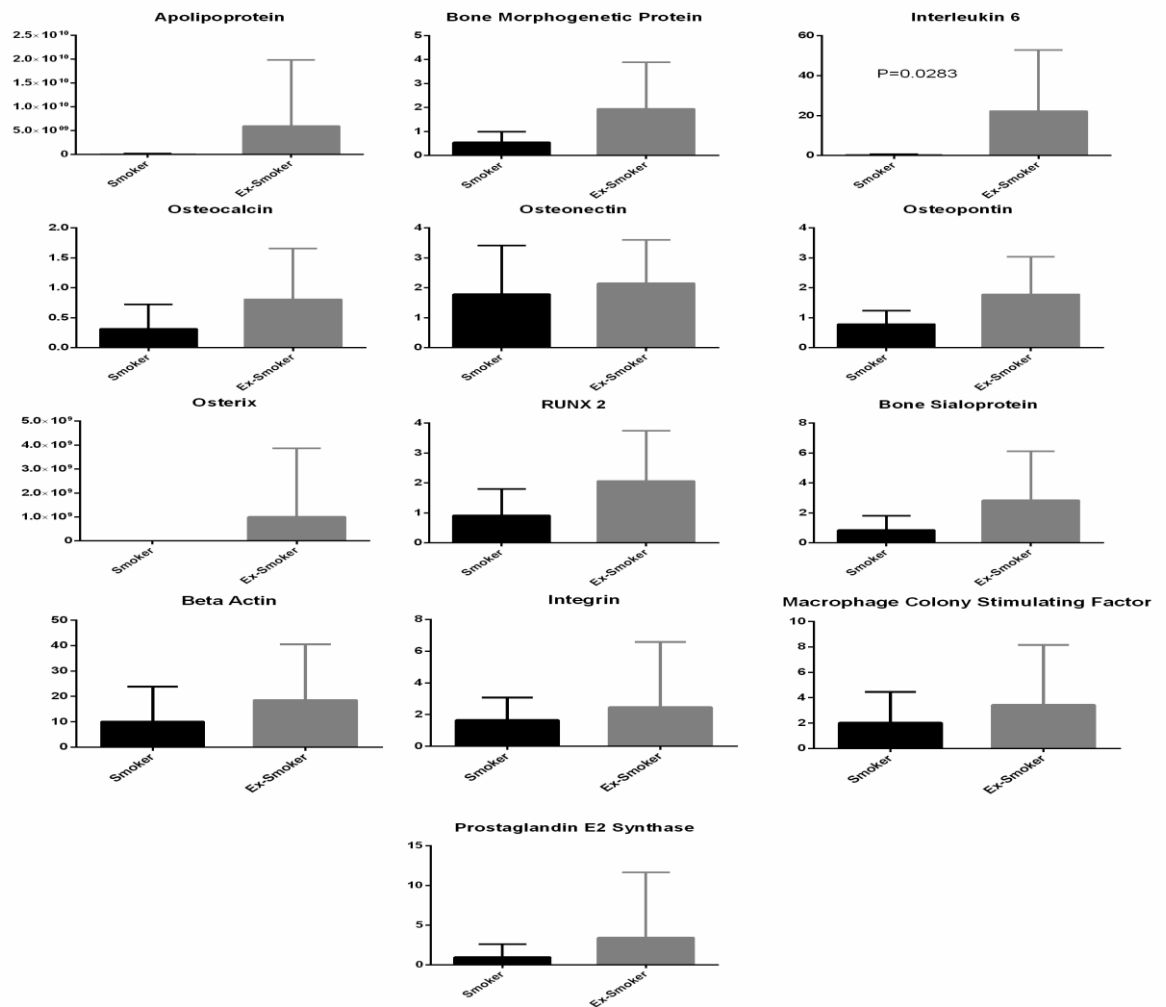
Legend: beta-actin, M-CSF, TGF-β, PGE2 synthase and significant higher value for the transcript Integrin β1 presented higher expression

Figure 4 and 5 - Results of comparisons between Control group and Hypertensive and Smoker group

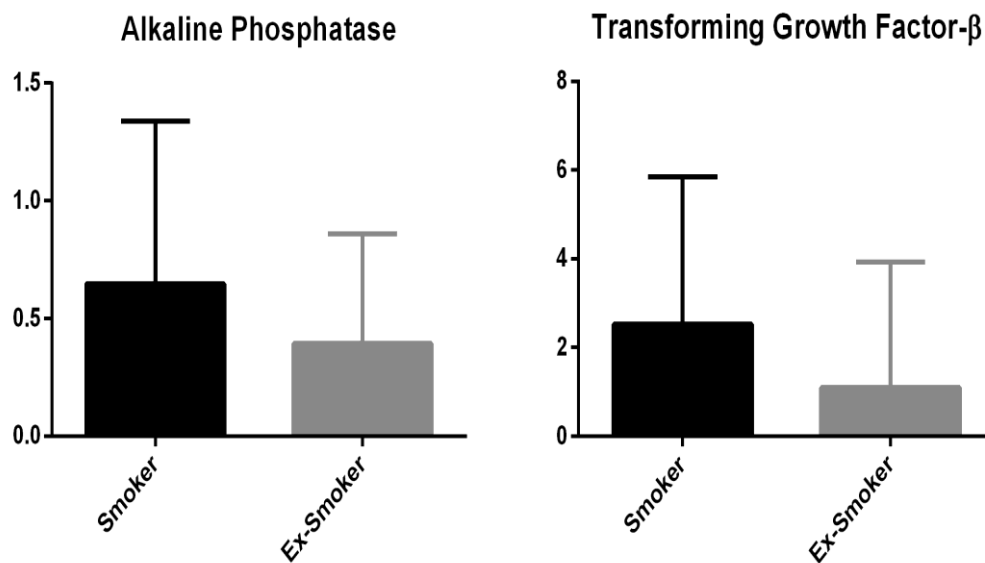


Legend: Genes presenting higher expression in control group were placed in figure 4 and genes presenting higher expression in Hypertensive and Smoker group were put together in figure 5. However, statistical analysis did not present significant differences between the groups.

Figure 6 and 7- Comparisons between Smoker group and Ex-Smoker group



Legend: demonstrated that most of genes were upregulated in Ex-smoker group when compared to Smoker group



Legend: Only alkaline phosphatase and TGF-β were upregulated in Smoker group

Table 2, presents the *p* values of comparisons; significant difference was only verified in the comparison of interleukin 6, which was higher in Ex-smoker group. Despite the fact that there were no significant differences, it's interesting to note that the group of genes involved in bone differentiation (BMP II, Osteocalcin, Osteopontin, Osterix, RUNX 2 and Bone Sialoprotein) which were downregulated in Smoker group comparing to control group and became upregulated in Ex-Smoker group comparing to Smoker group. The same behavior was demonstrated in expression of Interleukin 6, higher in Control and Ex-smoker groups, when compared to Smoker group.

Discussion

For a cell exert properly its function, it demands several molecules usually descendant from protein synthesis process. Protein synthesis is ruled by nuclear

control, from the genes (genomic DNA), which are transcribed into mRNA; protein translation occurs in the cytoplasm¹⁶. The present study aimed to analyze whether smoking or pharmacological control of hypertension would be factors that could modify, in the alveolar bone, the mRNA expression of some inflammatory proteins and bone metabolism markers. We sought to understand why smokers lose more implants than nonsmokers. So we choose real time PCR as a tool to quantify genic expression and then we compared the groups.

The high prevalence of patients under therapy to high blood pressure in this study motivated the inclusion of this group in the comparisons. The data was very interesting, since, in the group Hypertensive, the transcripts were downregulated, occurring significant differences in Interleukin 6 and RUNX2 expression; booth were also downregulated in Smoker group.

We also explore the genic expression in ex-smokers, to observe its behavior after interrupt the addiction, and in a group of smokers and hypertensive patients. However, the group containing smokers presenting under treatment to hypertension did not expressed the genes of osterix, osteocalcin, apolipoprotein and PGE2 and no significant differences were observed when this group was compared to control group.

Early failure arises before implant load and late failure occurs after the implant receive occlusal loading¹⁷. Early failures have been related to smoking, aging, and systemic diseases. Late failures have been related to peri-implantitis and occlusal trauma¹⁸. The criteria for evaluation of implant failure are commonly based on clinical and radiographic alterations. We did not examine implant failure, but we started our reasoning thing about conditions in which patient may present a disadvantage in its implant outcome, for example, smoking. The first goal of this study was to detect a

genetic component from an observational data; however, this study has the limitation of a small sample size, mainly our test group: the Smoker group. Previous papers presenting small sample size have been found in high quality literature¹⁹ and encouraged us to continue the publication process avoiding to delay the dissemination of results.

The epidemiological gold standard for prevalence studies is the probability or random sample. Herein we decide to perform a convenience sample, generally made up of samples of patients from hospital treatment services, despite the fact that it has several limitations, the most important of which is their lack of representativeness which means that results from such studies cannot be generalized to the whole population. However this method is much more cost-efficient than using a random sample²⁰.

Smoking may be a primary predictor for implant failure.²¹ Although smoking was associated with implant failure in most of individual studies²² and in the overall meta-analysis, the detrimental effect of smoking was not confirmed when only prospective data were assessed⁵.

Important advances about implant loss and genetic pathways have been described by a Brazilian research group. They mainly aim of the papers was to respond why some patients present dental implant failure without a clear clinical motive. Allele C of polymorphism rs2009658 of the Lymphotoxin alpha gene was associated with dental implant loss, as well as the presence of teeth and a greater number of placed implants. Their power of the sample, obtained when rejecting h_0 , was of 93.8%, and sample matched by age, gender, and smoking¹; vitamin D receptor gene may be a genetic risk marker for dental implant loss in patients who lost two or more dental implants⁷; there was a significant difference, in the presence

of the alleles presenting polymorphisms in the MMP-8 gene and MMP-1²³, between the control group and early implant loss group⁸; and the +33C allele for interleukin 4 gene was associated with susceptibility to dental implant loss²⁴. An explanation to all these polymorphisms influence implant loss is that the intronic polymorphism, interfering on exons splicing, may alter the primary protein structure and consequently its function¹.

Instead, neither IL-1⁹, IL-2, IL-6¹⁰, IL10⁶ nor MMP-9²³ polymorphisms were associated with susceptibility to dental implant failure in the studied population. Genetic predisposition may influence the osseointegration process failure through the accumulated effect of multiple polymorphisms²⁵.

Herein, our design considered clinic conditions that impair implant outcome, and screening genes that may be related to these conditions. Since clinical attachment loss, gingival index and plaque index did not differ in control group when comparing to implant failure group and the authors considered that the difference between groups in the periodontal pocket depth did not present significant clinical relevance¹, we did not evaluate periodontal status in the present study. However, there is a clear relationship between the peri-implantitis and implant failure⁴. No significant difference among patients was observed for age when analyzing implant loss³, so age was not target in our comparisons.

According our methods, the convenience sample was reduced due to exclusion of patients from which we obtained poor total RNA quality. Despite that, the PCR presents limitations such as the high cost of the accurate technique. Also, the level of expertise required to process samples and to carry out data analysis is very important. The specificity of PCR product could be altered by nonspecific binding of primers to the similar sequences. Our primers were tested previously^{13,14} and

presented high quality in efficiency curve analysis, in order to avoid these nonspecific bindings. We expected to use Beta actin as a housekeeping gene, instead, it presented borderline significance ($p=0.0578$) comparing control group and smoker group. The last was upregulated. So, type I Collagen was selected using Normfinder, a respected tool to find optimal normalization gene among a set of candidates. Despite the difficulties, the motivation to continue to apply traditional and new approaches of genetic analysis to the effort toward a better understanding of dental implant failure mechanisms is clear¹².

The comparison between control group e Hypertensive and Smoker group presented at a borderline significance ($P=0.0647$) for prostaglandin E2 synthase. The last demonstrated its expression downregulated. Instead, smokers presented higher expression of this inflammatory cytokine. This data was expected, since cytokines have a physiologic role in bone metabolism. However, high levels of them may lead to increased bone loss, resulting in a less favorable outcome or implant failure⁹. Conversely, IL-6 was downregulated in Smoker group and significantly upregulated in Ex-Smokers, comparing to Smokers. Major anti-inflammatory cytokines include interleukin (IL)-1 receptor antagonist, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, and IL-13²⁶. It seems reasonable to consider the hypothesis that smoking delay anti-inflammatory pathway in a reversible way, in case of stopping smoking.

The comparison between Smoker group e Ex-Smoker group presented at a borderline significance ($P= 0.0992$) for TGF- β 1. The last demonstrated downregulated. Since control group expressed less TGF- β 1, it sounds like a restorative expression pattern. Bone formation involves several steps from recruitment of osteoblast precursor cells to calcification of the extracellular matrix, and a variety of cytokines, growth factors, and other macromolecules take part in

these events¹⁰. Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) is a pleiotropic and ubiquitous cytokine involved in bone development and bone remodeling²⁷. Osteocytes directly remodel their perilacunar/canalicular matrix controlling bone quality through TGF- β signaling²⁸.

The opposite effect occurred in BMP II, Osteocalcin, Osteopontin, Osterix, RUNX 2 and Bone Sialoprotein, which were downregulated in smoker group, comparing to control group, and upregulated when patient stop smoking (borderline significance to osteocalcin and osteopontin, $p= 0.0806$ for both markers). The expression of these various proteins, characterize the bone phenotype, are induced during osteoblastic differentiation in a stepwise fashion, suggestive of multiple regulatory factors²⁹.

The transcript β 1 Integrin was significantly higher in Smoker group, comparing to control group. It is an important genic pattern since integrins are extremely important in osteoclast function. Osteoclasts attach to the bone matrix by means of integrins during bone resorption. Blocking β 1 Integrin resulted in inhibition of resorption³⁰. Hypertensive and smoker group presented higher level of β 1 Integrin, comparing to control group, however without statistical significance.

The last resorptive evidence was the upregulation of M-CSF in smoker group comparing to control group; in hypertensive and smoker group comparing to control group and in Ex-smoker group comparing to smoker group. Osteoclast formation involves interaction between stromal cells and preosteoclasts that are derived from monocytes lineages. M-CSF stimulates bone resorption only when it is dependent on generation of new osteoclasts. M-CSF does not appear to have any effect on the activity of mature osteoclasts. The mechanism of action might be direct on osteoclast precursors or indirect on accessory cells influencing osteoclast generation³¹.

RUNX 2 was significantly downregulated in hypertensive group comparing to control group. We believe this find is extremely important based on Kim et al. conclusion that the downregulation of RUNX-2, BMP-II, peroxisome proliferator–activated receptor gamma-2 (PPAR γ -2) and upregulation of RANKL/OPG ratio were correlated with early peri-implant marginal bone loss³². The authors isolated and cultured human alveolar mesenchymal stromal cells derived from bone chips obtained by low-speed drilling during implant placement to make this conclusion.

The most frequent antihypertensive in the present study was losartan which is prescribed particularly in the population over 60 years with more than half having hypertension. Despite therapy herein, the hypertensive patients demonstrated downregulation of genes which is not in accordance with literature; losartan increased the osseointegration in a tibia model of spontaneously hypertensive rats (Mulinari-Santos et al. 2018) and prevented systemic bone loss in hypertensive patients, thereby also supporting the quality of the alveolar bone before implants are placed (Fabris et al. 2017).

Despite all significant results presented herein, we assume that replications in other populations are mandatory to better elucidate the role of this genes in influencing individual susceptibility to dental implant loss. In the future, individual therapeutics could be developed, increasing the implant success rates.

References

1. *Broker R de C, Doetzer AD, de Souza CM, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC. Clinical aspects and polymorphisms in the LTA, TNFA, LTB genes and association with dental implant loss. Clin Implant Dent Relat Res. 2018;20(6):954-961. doi:10.1111/cid.12677*

2. Montes CC, Alvim-Pereira F, de Castilhos BB, Sakurai MLL, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):208-217. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01629.x
3. Montes CC, Pereira FA, Thomé G, et al. Failing factors associated with osseointegrated dental implant loss. *Implant Dent.* 2007;16(4):404-412. doi:10.1097/ID.0b013e31815c8d31
4. Becker ST, Beck-Broichsitter BE, Rossmann CM, Behrens E, Jochens A, Wiltfang J. Long-term Survival of Straumann Dental Implants with TPS Surfaces: A Retrospective Study with a Follow-up of 12 to 23 Years. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(3):480-488. doi:10.1111/cid.12334
5. Chambrone L, Preshaw PM, Ferreira JD, Rodrigues JA, Cassoni A, Shibli JA. Effects of tobacco smoking on the survival rate of dental implants placed in areas of maxillary sinus floor augmentation: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(4):408-416. doi:10.1111/clr.12186
6. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Montes CC, et al. Genetic association study between Interleukin 10 gene and dental implant loss. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1256-1263. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.020
7. Pereira TM, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Ignácio SA, de Souza CM, Trevilatto PC. A complete physical mapping of the VDR gene for dental implant loss: a pilot study. *Clin Oral Implants Res.* August 2019. doi:10.1111/clr.13529
8. Costa-Junior FR, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC, de Souza AP, Santos MCLG. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):311-316. doi:10.1007/s00784-012-0699-z

9. Campos MIG, Santos MCLG, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJB, Line SRP. Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure in non-smoking patients. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):194-201. doi:10.1111/j.1600-0501.2004.01091.x
10. Campos MIG, Godoy Dos Santos MCL, 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):391-398. doi:10.1097/01.id.0000188470.54417.98
11. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol.* 2016;20(2):128-135. doi:10.4103/0972-124X.176391
12. Alvim-Pereira F, Montes CC, Mira MT, Trevilatto PC. Genetic susceptibility to dental implant failure: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 23(3):409-416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18700362>. Accessed September 30, 2019.
13. do Prado RF, Rabêlo SB, de Andrade DP, et al. Porous titanium and Ti–35Nb alloy: effects on gene expression of osteoblastic cells derived from human alveolar bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(11). doi:10.1007/s10856-015-5594-0
14. Gagliardi CF, de VasConCellos LMR, Cairo CAA, Rabelo SB, Do Prado RF. Expression of BMP ii by human osteoblasts cultivated on dense or porous titanium. *Brazilian Dent Sci.* 2018;21(3):275-281. doi:10.14295/bds.2018.v21i3.1586
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods.*

- 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
16. Dermitt M, Dodel M, Mardakheh FK. Methods for monitoring and measurement of protein translation in time and space. *Mol Biosyst.* 2017;13(12):2477-2488. doi:10.1039/c7mb00476a
 17. Esposito M, Hirsch J-M, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants, (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):527-551. doi:10.1046/j.0909-8836..t01-2-.x
 18. Sakka S, Baroudi K, Nassani MZ. Factors associated with early and late failure of dental implants. *J Investig Clin Dent.* 2012;3(4):258-261. doi:10.1111/j.2041-1626.2012.00162.x
 19. Pereira AC, Souza PPC, Souza JAC, Silva TA, Batista AC, Ribeiro-Rotta RF. Histomorphometrical and molecular evaluation of endosseous dental implants sites in humans: Correlation with clinical and radiographic aspects. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(4):414-421. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02338.x
 20. Dunn J, Ferri CP. Epidemiological methods for research with drug misusers: Review of methods for studying prevalence and morbidity. *Rev Saude Publica.* 1999;33(2):206-215. doi:10.1590/S0034-89101999000200013
 21. Zhang F, Finkelstein J. <p>The relationship between single nucleotide polymorphisms and dental implant loss: a scoping review</p>. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2019;Volume 11:131-141. doi:10.2147/ccide.s207445
 22. Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. Baradaran HR, ed. *PLoS One.* 2013;8(8):e71955. doi:10.1371/journal.pone.0071955

23. Santos MCL, Campos MIG, Souza AP, Trevilatto PC, Line SRP. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 19(1):38-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982353>. Accessed September 30, 2019.
24. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CCK, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of Interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant Dent.* 2014;23(6):723-731. doi:10.1097/ID.0000000000000157
25. Dirschnabel AJ, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Bernardino JF, Rosa EAR, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(11):1235-1241. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.02080.x
26. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000;117(4):1162-1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162
27. Saiganesh S, Saathvika R, Arumugam B, et al. TGF- β 1-stimulation of matrix metalloproteinase-13 expression by down-regulation of miR-203a-5p in rat osteoblasts. *Int J Biol Macromol.* 2019;132:541-549. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.003
28. Dole NS, Mazur CM, Acevedo C, et al. Osteocyte-Intrinsic TGF- β Signaling Regulates Bone Quality through Perilacunar/Canalicular Remodeling. *Cell Rep.* 2017;21(9):2585-2596. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.115
29. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1991;1(2):85-98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1802105>. Accessed October 1, 2019.

30. Helfrich MH, Nesbitt SA, Lakkakorpi PT, et al. $\beta 1$ integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone*. 1996;19(4):317-328. doi:10.1016/S8756-3282(96)00223-2
31. Corboz VA, Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, van der Pluijm G, Löwik CW. Effect of macrophage colony-stimulating factor on in vitro osteoclast generation and bone resorption. *Endocrinology*. 1992;130(1):437-442. doi:10.1210/endo.130.1.1727717
32. Kim D-J, Kim S-K, Cha J-K, Lee J-S, Kim C-S. Clinical Factors and Cellular Responses of In Situ Human Alveolar Bone-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated With Early Periimplant Marginal Bone Loss: A Prospective Cohort Pilot Study. *Implant Dent*. 2019;28(5):421-429. doi:10.1097/ID.0000000000000904

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Considerações metodológicas

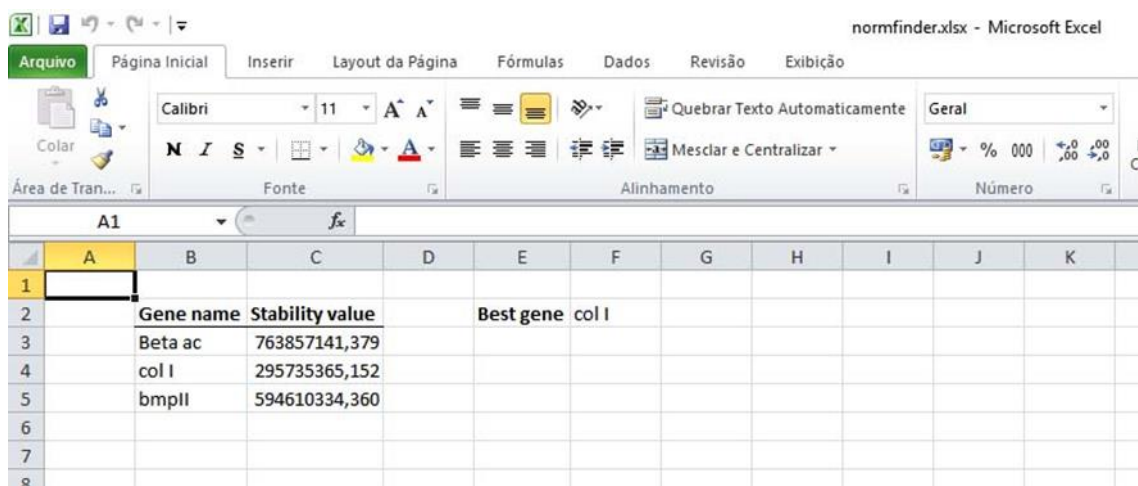
Um dos métodos mais utilizados para estudos da expressão gênica é a quantificação relativa da expressão de mRNA pela transcrição reversa quantitativa em tempo real da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR) (Thellin et al., 2009). Sendo que para a sua realização é necessária uma série de parâmetros experimentais incluindo: a) a determinação de um número adequado de repetições biológicas; b) o rigoroso controle de qualidade nas etapas de extração de RNA da amostra e transcrição reversa; e c) a seleção e validação adequadas de genes de referência que serão utilizados como controles para normalizar os dados na análise de quantificação relativa (Taylor, Mrkusich, 2014).

Com o intuito de padronizar o delineamento dos ensaios de qPCR e RT-qPCR e reduzir o número de resultados inconsistentes devido ao delineamento experimental inadequado, foram propostas diretrizes na informação mínima para publicação de experimentos quantitativos de PCR em tempo real (*MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) em 2009 (Stephen et al. 2009). O atual estado de implementação das normas MIQE foi recentemente revisto (Bustin et al., 2013; Taylor, Mrkusich 2014). Especificamente, as diretrizes apontam que o uso de um único gene de referência não validado para a normalização dos resultados de RT-qPCR geralmente não é aceitável (Kozera, Rapacz, 2013). O delineamento ideal exigiria entre três e cinco bons genes de referência (Taylor et al., 2010). Para isso, recomenda-se testar a estabilidade de aproximadamente 6–10 genes de referência de candidatos em cada uma das condições experimentais avaliadas, utilizando softwares apropriados como geNorm e NormFinder (Taylor, Mrkusich, 2014).

Nesse presente estudo, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene endógeno proposto beta-actina e outros 2 genes constitutivos (colágeno I e BMP II), testados quanto à variação em todas as

amostras para selecionar o melhor. O que se manteve mais estável, colágeno I, foi selecionado (conforme o software NormFinder) e utilizado nas reações, para realização dos cálculos da Quantificação Relativa.

Figura 8- Escolha do gene endógeno



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2		Gene name	Stability value		Best gene	col I					
3		Beta ac	763857141,379								
4		col I	295735365,152								
5		bmp1l	594610334,360								
6											
7											
8											

Legenda: Colágeno I selecionado como gene constitutivo

Foi utilizado nesse trabalho o software NormFinder que é um algoritmo para identificar o gene de normalização ideal entre um conjunto de candidatos. Ele classifica o conjunto de genes de normalização de acordo com sua estabilidade de expressão em um determinado conjunto de amostras e de um experimento. O algoritmo está enraizado em um modelo matemático de expressão gênica e usa um quadro estatístico sólido para estimar não apenas a variação da expressão geral dos genes de normalização do candidato, mas também a variação entre os subgrupos de amostra do conjunto de amostras exemplo, amostras controles e não-controles. Assim fornece um valor de estabilidade para cada gene, que é uma medida direta para a variação de expressão estimada, permitindo ao usuário avaliar o erro sistemático introduzido ao usar o gene para normalização e como requisito básico requer um mínimo de 3 genes e um mínimo de 2 amostras por grupo (Andersen et al., 2004).

Os dois métodos mais comumente utilizados para analisar dados de experimentos de PCR quantitativo e em tempo real são a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número da cópia da

entrada, geralmente relacionando o sinal do PCR a uma curva padrão. A quantificação relativa relaciona o sinal da PCR do transcrito-alvo em um grupo de tratamento ao de uma outra amostra tal como um controle não tratado. Compara pares de amostras verificando se um gene alvo se tornou mais ou menos abundante em relação ao gene de controle, cuja expressão é assumida como constante. Esta aproximação é atrativa por causa de sua eficaz matemática e da habilidade de corrigir para quantidades desiguais de material biológico entre amostras usando o gene do controle como um padrão interno. Como desvantagem, no entanto, ela se baseia em comparações pareadas de amostras e, portanto, dificulta o manuseio de designs experimentais mais elaborados, particularmente envolvendo interações entre fatores (Matz et al., 2013).

Após determinação dos padrões da RT-PCR, os valores de Ct de todas as reações com as amostras foram utilizados nos cálculos a seguir (Livak, Schmittgen, 2001). A expressão de cada gene foi calculada para todas as amostras e foi subtraído o Ct do gene constitutivo: $\Delta C_t = C_{t(\text{gene})} - C_{t(\text{constitutivo})}$

O ΔC_t subtraído da amostra calibrador resultando em $\Delta\Delta C_t$: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t(\text{calibrador})}$. Então a quantificação relativa (RQ - *Relative Quantification*) foi calculada para cada gene em cada amostra conforme a equação: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

Após a normalização, vários autores utilizaram abordagens paramétricas, como ANOVA (Regier, Frey, 2010; Luu, 2005) e modelos lineares mistos (Poletto et al., 2006; Poletto et al., 2011; Kenkel et al., 2011) aplicados em uma base *gene-by-gene*, para alcançar a máxima versatilidade na análise de designs complicados. O fluxo de trabalho envolvendo correção para eficiência de amplificação seguido de normalização multigênica e análise *gene-by-gene* com testes t, ANOVA ou modelagem linear representa o consenso atual do processamento de dados de qRT-PCR (Ling, 2012).

Nesse presente estudo, dados também foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney foi realizada com 5% de significância.

Nessa pesquisa foi utilizado nessa pesquisa o SYBR® Green que é um corante fluorescente comumente usado que liga moléculas de DNA de duas fitas intercalando entre as bases de DNA e foi usado em PCR em tempo real porque a

fluorescência pode ser medida no final de cada ciclo de amplificação. A fluorescência aumenta juntamente com a concentração de DNA.

A curva de amplificação segue um padrão de aumento do produto gerado obedecendo três fases: exponencial, linear e platô. À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, ocorre o aumento do número de fluoróforos livres e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma. O ciclo em que o limiar é atingido é denominado CT (Threshold Cycle – nº de ciclos) e é inversamente proporcional à concentração de produto gerado da reação. De modo a garantir que as técnicas de RT-qPCR alcancem elevados níveis de sensibilidade e especificidade, é necessário a padronização protocolo com a finalidade de evitar problemas de execução tais como: aparecimento de produtos inespecíficos, baixa eficiência na amplificação, contaminações e impurezas das amostras (Roche Applied Science, 2006; Applied Biosystems, 2007).

A análise da curva de melting apresenta vantagens como: é um método simples e robusto, apresenta rapidez na execução das análises, aplicável à ampla gama de ensaios genômicos e detecção de alterações genéticas para fins de pesquisa e de diagnósticos clínicos, não é necessária a utilização de eletroforese e de reagentes mutagênicos para a visualização dos fragmentos, elimina a necessidade da utilização de sondas de primers, reduz a possibilidade de contaminação, devido ao simples processo de preparação das amostras ou a automação aplicada, não requer nenhum processamento de pós-PCR. No entanto possui como desvantagens: a preferência pela utilização de fragmentos pequenos, estes conduzem a uma flexibilidade reduzida na síntese dos primers, outras variantes genéticas presentes no fragmento amplificado podem conduzir a erros de interpretação, pois pode alterar o padrão de curva da mutação em análise e alterações genéticas classes 3 e 4 (trocas G/C e A/T) podem ser mais difíceis de diferenciar (Anstaett et al., 2010; Tricarico et al., 2002).

3.2 Considerações sobre os resultados

O padrão epidemiológico ouro para estudos de prevalência é a probabilidade ou amostra aleatória. Neste trabalho, decidimos realizar uma amostra de conveniência, composta de amostras de pacientes de tratamento hospitalar, apesar do fato de apresentarem várias limitações, sendo a mais importante a falta de representatividade, ou seja, os resultados de tais estudos não podem ser generalizados para toda a população. No entanto, esse método é muito mais eficiente em termos de custo do que usar uma amostra aleatória.

O artigo de Becker et al. (2015) foi utilizado como uma inspiração, fornecendo os percentuais de 57,14% de fumantes que perderam ao menos um dos implantes no estudo, contrapondo 16,9% de não fumantes que perderam ao menos um dos implantes. Já que sabemos que fumantes perdem mais implantes, gostaríamos de mostrar geneticamente o porquê, por meio deste estudo epidemiológico.

Foram coletadas amostras de 40 pacientes, entretanto após análise molecular foi determinada a exclusão de 8 pacientes pois estes não apresentaram o gene constitutivo (Colágeno I) expressivo. Os 32 pacientes estudados foram divididos em grupos: a) Controle (17), b) Terapia anti-hipertensiva (6), c) Fumantes (3), d) Fumantes e Terapia anti-hipertensiva e e) Ex-fumantes (3).

A alta prevalência de pacientes em terapia anti-hipertensiva neste estudo motivou a inclusão desse grupo nas comparações. Os dados foram muito interessantes, uma vez que, no grupo de terapia anti-hipertensiva, as transcrições foram reduzidas, ocorrendo diferenças significativas na expressão de interleucina 6 e RUNX2; também foram reduzidas no grupo fumantes.

Também exploramos a expressão gênica em ex-fumantes, para observar seu comportamento após interromper o vício, e em um grupo de tabagistas e hipertensos. No entanto, o último grupo não expressou os genes de osterix, osteocalcina, apolipoproteína e PGE2 e não foram observadas diferenças significativas quando este grupo foi comparado ao grupo controle.

A comparação entre grupo controle e grupo hipertensivo e fumante apresentou significância limítrofe ($P = 0.0647$) para a prostaglandina E2 sintase. Já os fumantes apresentaram maior expressão dessa citocina inflamatória. Estes dados foram esperados, uma vez que as citocinas inflamatórias têm um papel fisiológico no metabolismo ósseo. No entanto, altos níveis podem levar ao aumento da perda óssea, resultando em um desfecho menos favorável ou na falha do implante (Campos et al., 2005). Inversamente, IL-6 foi diminuída no grupo fumante e significativamente aumentada em ex-fumantes, comparando com fumantes. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem o antagonista do receptor da interleucina IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-1326 (Opal, DePalo, 2000). Parece razoável considerar a hipótese de que o tabagismo prejudica a homeostasia, já que diminuiu a expressão desta citocina anti-inflamatória de forma reversível, em caso interrupção do vício fumar.

A comparação entre o grupo tabagista e o ex-fumante apresentou significância limítrofe ($P = 0,0992$) para TGF- β 1. Já que o grupo controle expressou menos TGF- β 1, soa como um padrão restaurativo da expressão. A formação óssea envolve várias etapas do recrutamento de células precursoras de osteoblastos para calcificação da matriz extracelular, e uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e outras macromoléculas participam desses eventos (Campos et al., 2005). O fator de crescimento transformador (TGF- β 1) é uma citocina pleiotrópica e onipresente envolvida no desenvolvimento ósseo e na remodelação (Saiganesh et al., 2019). Os osteócitos remodelam diretamente sua matriz perilacunar/canalicular controlando a qualidade óssea através da sinalização TGF- β (Dole et al., 2017).

O efeito oposto ocorreu em BMP II, osteocalcina, osteopontina, Osterix, RUNX 2 e Sialoproteína óssea, que foram reduzidos no grupo fumante, comparando com o grupo controle, e aumentados quando o paciente deixou de fumar (significância borderline para osteocalcina e osteopontina, $p = 0,0806$ para ambos). A expressão destas várias proteínas caracteriza o fenótipo ósseo, é induzida durante a diferenciação osteoblástica em cascata, sugestivo de fatores regulatórios múltiplos (Rodan, Noda, 1991).

A transcrição da integrina β 1 foi significativamente maior no grupo tabagista, comparando-se ao grupo controle. É um padrão gênico importante, uma vez que as

integrinas são extremamente importantes na função osteoclástica. Osteoclastos se ligarão à matriz óssea por meio de integrinas durante a reabsorção óssea. O bloqueio da integrina $\beta 1$ resultou na inibição da reabsorção (Helfrich et al., 1996). O grupo hipertensivo e fumante apresentou maior nível de integrina $\beta 1$, comparando-se ao grupo controle, porém sem significância estatística.

A última evidência reabsortiva foi a desregulação do M-CSF no grupo de fumantes quando comparado ao grupo controle; no grupo hipertensivo e tabagista em comparação ao grupo controle e no grupo ex-fumante em comparação ao grupo fumante. A formação de osteoclastos envolve a interação entre células estromais e pré-osteoclastos que são derivados das linhagens dos monócitos. O M-CSF estimula a reabsorção do osso somente quando é dependente da geração de osteoclastos novos. O M-CSF não parece ter nenhum efeito na atividade de osteoclastos maduros. O mecanismo da ação pôde ser direto em precursores do osteoclastos ou indireto em vias de sinalização acessórias que influenciam a geração do osteoclastos (Corboz et al., 1992).

O RUNX 2 foi significativamente reduzido no grupo hipertensivo comparando com o grupo controle. Acreditamos que esse achado é extremamente importante com base na conclusão de Kim et al. de que a desregulação de Runx-2, BMP-II, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (pparg-2) e aumento da razão RANKL/OPG foram correlacionados com o início do perda óssea marginal peri-implante (Kim et al., 2019). Os autores isolaram e cultivaram células estromais mesenquimais alveolares humanas derivadas de osso obtidos pela perfuração durante a colocação do implante para fazer esta conclusão.

Nesse presente estudo, as amostras foram coletadas da região anterior da maxila (12,5%), da mandíbula (8,34%), posterior de maxila (35,41%) e posterior de mandíbula (43,75%), portanto com predominância do tipo ósseo I. Um parâmetro de extrema importância e que também influencia a osseointegração e o sucesso do tratamento com implantes é a análise óssea da área receptora do implante. A classificação de Misch 1990 é a mais encontrada na implantodontia e pode ser encontrada na literatura como: tipo I – osso cortical denso; tipo II – cortical denso e osso trabeculado grosso; tipo III – cortical óssea fina e trabeculado fino; tipo IV – osso trabecular fino. Como para a implantodontia é necessário uma boa estabilidade

primária, mas com irrigação sanguínea suficiente para que o metabolismo local não seja prejudicado e facilite a cicatrização e consequente osseointegração, os tipos ósseos I e IV desta classificação não são bons candidatos à colocação de implantes. O primeiro, por possuir uma cortical muito densa, dificulta a irrigação sanguínea, apesar de ser excelente para a estabilidade primária. O segundo, apesar da boa irrigação, por ser totalmente de osso trabecular fino, é desvantajoso em relação à estabilidade primária.

Apesar de todos os resultados significativos aqui apresentados, assumimos que as repetições em outras populações são obrigatórias para melhor elucidar o papel desses genes na influência da suscetibilidade individual à perda do implante dentário. No futuro, a terapêutica individual poderia ser desenvolvida, aumentando as taxas de sucesso do implante.

REFERÊNCIAS*

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004, Aug 1;64(15):5245-50. PMID:15289330. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Anstaett OL, Brownlie J, Margaret E, Collins CJT. Validation of endogenous reference genes for RT-qPCR normalisation in bovine lymphoid cells (BL-3) infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Vet Immunol Immunopathol.* 2010 Oct 15;137(3-4):201-7. Epub 2010 Jun 1. doi:10.1016/j.vetimm.2010.05.006
- Applied Biosystems [Internet]. Guide for Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments [cited 2019 Apr 04]. Disponível em: <http://appliedbiosystems.gene-quantification.info>, 2007
- Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Ö Hman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plastic Reconstruct Surg.* 1977;16:1-132
- Bustin AS, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods.* 2013 Nov;10(11):1063-7. PMID:24173381 doi: 10.1038/nmeth.2697
- Cheng LL. Limited evidence suggests higher risk of dental implant failures in smokers than in nonsmokers. *J Am Dent Assoc.* 2016 Apr;147(4):292-4. doi: 10.1016/j.adaj.2016.01.003. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26851818
- Hartmann ES, Kohler MI, Huber F, Redeker JI, Schmitt B, Schmitt-Sody M. Factors regulating bone remodeling processes in aseptic implant loosening. *J Orthop Res.* 2017;35:248-57. PMID:27116254 doi: 10.1002/jor.23274
- Kenkel CD, Aglyamova G, Alamaru A, Bhagooli R, Capper R. Development of gene expression markers of acute heat-light stress in reef-building corals of the genus *Porites*. *PLoS One.* 2011;6(10):e26914. doi: 10.1371/journal.pone.002691.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013 Nov;54(4):391-406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
- Ling DJ. qPCR: Robust and Rapid Analysis of RT-qPCR Data in SAS. *Plos One.* 2012;7(1):e29788. doi: 10.1371/journal.pone.0029788

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques*. 2005;38:287–93. doi: 10.2144/05382RR05
- Matz MV, Wright RM, Scott JG. No Control Genes Required: Bayesian Analysis of qRT-PCR Data. *Plos One*. 2013 Aug;8(8):e71448. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071448>
- Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Apr-Jun;9(2):61-71. PMID:19516081.
- Misch C. Classifications and treatment options of the completely edentulous arch in implant dentistry. *Dent Today*. 1990 Oct;9(8):26, 28-30. PMID:2132103
- Mulinari-Santos G, Batista FRS, Kirchweiger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Impl Res*. 2018;29:1126–34. doi:10.1111/clr.13376
- Poletto R, Cheng HW, Meisel RL, Richert BT, Marchant-Forde JN. Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a beta-adrenoreceptor agonist. *Brain Res*. 2011;1381:11–20. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.035
- Poletto R, Steibel JP, Siegford JM, Zanella AJ. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. *Brain Res*. 2006;1067:36–42. doi:10.1016/j.brainres.2005.10.001
- Regier N, Frey B. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol*. 2010 Aug 11;11:57. doi: 10.1186/1471-2199-11-57
- Stephen A, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Taylor SC, Mrkusich EM. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2014;24(1):46-52. doi: 10.1159/000356189
- Tibazarwa KB, Damasceno AA. Hypertension in developing countries. *Can J Cardiol*. 2014 May;30(5):527-33. doi: 10.1016/j.cjca.2014.02.020
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.

Analytical Biochemistry. 2002 Oct;309(2):293-300 [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00311-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00311-1)

ANEXO A – Comprovante de artigo submetido



Clinical and Molecular findings correlations in patients under dental implant surgery

Journal:	<i>Clinical Oral Implants Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Prado, Renata ; Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department Social Dentistry Tarallo, Alessandra; Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department of Restorative Dentistry Vasconcellos, Luana; Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department Bioscience and Oral Diagnosis Silva, Alecsandro; ICT UNESP Nishioka, Renato; Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department of Prosthodontic and Dental Material Borges, Alexandre; Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista, Department of Prosthodontic and Dental Material
Keywords:	Epidemiology, Smoking, Genetics

SCHOLARONE™
Manuscripts

Ativar o V
Acesse Conf

Dear Editor,

This letter is to express our interest in submitting the paper entitled “Clinical and Molecular findings correlations in patients under dental implant surgery” to publication in this journal.

Based on our data, systemic factors may cause genetic alterations in alveolar bone that may help to understand why for example, smokers lose more implants than no smokers.

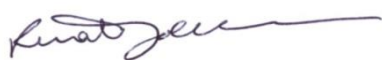
This manuscript has been submitted solely to this journal, is original, not been published previously, not presently under consideration for publication elsewhere, and free of conflict of interest.

All of the named authors were involved in the work leading to the publication of the paper and have reviewed the final paper prior to its submission. They participated sufficiently in the work to make our public responsibility for its content.

In online authors guidelines there is no mention of the maximum of six authors, so I, as correspondence author decide to submit the paper without two important authors in the draft system, but they are listed in authors contributions and in title page of manuscript document.

Yours sincerely,

São José dos Campos, 10/09/19

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'Renata Falchete do Prado', with a long horizontal flourish extending to the right.

Renata Falchete do Prado

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNESP - INSTITUTO DE CIÊNCIA E

TECNOLOGIA - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS

CAMPOS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo coorte da influência do tabagismo, e outros fatores sistêmicos, sobre a reabilitação com implantes: avaliação clínica e molecular da osseointegração

Pesquisador: Renata Falchete do Prado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83499418.1.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.538.469

Apresentação do Projeto:

O presente projeto está bem redigido e fundamentado.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão gênica dos marcadores do metabolismo ósseo e correlacioná-los com o vício de fumar, e o sucesso e insucesso dos implantes. Também almeja-se avaliar a evolução da osseointegração. Determinar fatores preditivos de sucesso de tratamento; quantificando citocinas inflamatórias por ELISA e correlacionando ao status da altura óssea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Por essência, os estudos observacionais apresentam riscos mínimos aos pacientes. Durante a anamnese podem se constranger ao não se recordarem ou não saberem explicar seu histórico médico.

Se constranger ao responder, durante a anamnese, sobre vícios deletérios à saúde como abuso de álcool e drogas ilícitas.

Sentirem incômodo (discreta dor) na área da punção do exame de glicemia.

Benefícios:

Em caso da pesquisa mostrar fatores preditivos de insucesso na terapia com implantes, ao determinar marcadores moleculares preditivos de osseointegração debilitada, podemos orientar condutas terapêuticas mais direcionadas aos pacientes com demandas individuais. Como exemplo: prescrição de fármacos com ação específica em células que reabsorvem o osso, na tentativa de melhorar o sucesso a longo prazo do implante e da prótese instalada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores apresentaram ter grande conhecimento sobre a área da pesquisa que será abordado no trabalho.

A realização da presente pesquisa irá proporcionar um melhor entendimento de marcadores gênicos do metabolismo ósseo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

N/D

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_1077435.pdf	19/02/2018 11:24:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocep.docx	19/02/2018 11:24:02	Renata Falchete do Prado	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoCEPassinada.pdf	19/02/2018 11:23:39	Renata Falchete do Prado	Aceito
TCLE / Termos de Consentimento /Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/02/2018 11:21:04	Renata Falchete do Prado	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP

SAO JOSE DOS CAMPOS, 12 de Março de 2018

Assinado por Denise Nicodemo (Coordenador)