



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Análise da citocina IL-1 β e do polimorfismo do gene IL-1B +3954 em pacientes com implantes osseointegrados

ARARAQUARA
2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Rafaela Fernanda Melo

**Análise da citocina IL-1 β e do polimorfismo do
gene IL-1B +3954 em pacientes com implantes
osseointegrados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Glória Maria Thompson Galli

Co-Orientador:

Prof^a. Dra. Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

ARARAQUARA
2006

Melo, Rafaela Fernanda

Análise da citocina IL-1 β e do polimorfismo do gene IL-1B
+3954 em pacientes com implantes osseointegrados / Rafaela
Fernanda Melo. – Araraquara: [s.n.], 2006.

61 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Thompson Galli

Co-orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

1. Fluido crevicular gengival 2. Interleucina – 1
3. Polimorfismo (Genética) 4. Implante dentário I. Título.

Dados Curriculares

Rafaela Fernanda Melo

Nascimento 23 de março de 1979 – Sorocaba – S.P.

Filiação José Benedito Melo

Eda Aparecida Benette Melo

1999/2002 Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

2003 Estágio de atualização junto a disciplina de Periodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2004/2006 Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Dedicatória

A meus pais José Benedito e Eda Ap. B. Melo por todo incentivo e dedicação para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu irmão que mesmo longe sempre esteve presente em todos os momentos.

Agradecimentos especiais

Ao meu namorado, Marcelo Capi Rodrigues, por toda a paciência, companheirismo e dedicação mesmo nos momentos mais difíceis.

A Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio, por todos os anos de orientação, confiança, amizade e respeito.

A Prof^a. Dr^a. Glória Maria Thompsom Galli, pela atenção, paciência e amizade que surgiu durante este período.

Ao Prof^o. Dr. Elcio Marcantonio Jr por disponibilizar os pacientes do Curso de Especialização em Implantodontia para a realização deste trabalho.

As amigas Daniela Zandin, Marita Miotto e Bia pelos anos de convivência e amizade.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas da sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e vice-diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla que me acolhe desde 1999.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação - Área de Periodontia, Prof Dr. Carlos Rossa Junior, e a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação, pela formação e exemplo.

Aos amigos e Docentes da Disciplina de Periodontia desta faculdade, Prof. Dr. Benedicto Egbert Corrêa de Toledo, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico, que colaboraram com a minha formação de tão variadas formas.

A Regina Lúcia pela paciência, cooperação e empenho para que tudo seja da forma mais organizada possível.

Ao Prof. Sandro Valentim por disponibilizar o uso do meu laboratório.

A todos os funcionários da disciplina de Periodontia, Claudia, D. Maria do Rosário, D. Teresinha, Maria José, Thelma, Sueli e Toninho, cujo trabalho, dedicação e compreensão possibilitaram a realização desse trabalho.

A todos os funcionários da Biblioteca, em especial a Ceres pela correção da tese.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Mara, Rosângela, e Alexandre.

Aos amigos Araraquarenses, Rui Magalhães, Manoel e Aninha pelos momentos de descontração.

A amiga Sabrina Aquino pela ajuda e companheirismo.

A todos os meus colegas de curso, Dani, Rafa Faeda, Rafa Sartori, Mauricio, Miltom, Dani Spirandelli, Denise, Débora e Gabriela pela amizade e companheirismo.

A toda minha família, por compreender os meus sonhos.

A CAPES e FAPESP (Processo nº 04/06550-3), pela concessão do auxílio financeiro.

Sumário

1 Introdução	8
2 Proposição.....	16
3 Material e Método.....	18
3.1 Seleção da amostra.....	19
3.2 Procedimentos clínicos.....	20
3.3 Coleta do fluido crevicular.....	21
3.4 Coleta de células da mucosa bucal.....	22
3.5 Avaliação da concentração de IL-1β no fluido crevicular.....	22
3.6 Avaliação do polimorfismo IL-1B +3954.....	23
3.7 Coloração por nitrato de prata.....	25
4 Resultados.....	27
4.1 Análise dos pacientes e implantes.....	28
4.2 Análise da concentração de IL-1β no fluido crevicular gingival e periimplantar.....	30
4.3 Análise do polimorfismo do gene IL-1B +3954.....	31
5 Discussão.....	35
6 Conclusão.....	42
7 Referências.....	44
8 Anexos.....	52
9 Resumo.....	57
10 Abstract.....	60

1 Introdução

Os implantes osseointegrados vêm sendo amplamente utilizados, com alto índice de sucesso, para a reabilitação oral (ADELL et al., 1981; LINDQUIST et al., 1996; MURATA et al., 2002) e tem sido uma alternativa preditiva à terapia protética convencional (HANISH et al., 1997). No entanto, a falência destes implantes devido à infecção bacteriana tem sido relatada por diversos estudos (ESPOSITO et al., 1998a,b; LEONHARDT et al., 1999; LINDHE et al., 1992; LISTGARTEN e LAI, 1999; SCHOU et al., 1996).

A doença periimplantar, assim como a doença periodontal, tem como fator etiológico primário bactérias específicas relacionadas ao acúmulo de placa bacteriana (LÖE et al., 1965; LISTGARTEN, 1988; SCHOU et al., 1992; BERGLUNDH et al., 1992; RUTAR et al., 2001). Estudos microbiológicos têm demonstrado que tecidos em condições de saúde periimplantar apresentam uma população microbiana predominantemente composta de cocos Gram-positivos facultativos (MOMBELLI et al., 1987; SCHOU et al., 1996). Com a progressão da doença, assim como na doença periodontal, ocorre uma alteração na composição microbiana, predominando bastonetes Gram-negativos anaeróbios (SCHOU et al., 1992, 1996).

Embora exista semelhança nas espécies bacterianas encontradas nos sítios periodontais e periimplantares, o tecido mucoso nestas duas

condições apresenta diferenças importantes ao processo inflamatório. Nos implantes osseointegrados as fibras colágenas supra-ósseas estão orientadas paralelas à superfície do implante, sem inserção nesta superfície, enquanto que nos dentes as fibras colágenas são perpendiculares e estão inseridas no cimento (HANISCH et al., 1997). O tecido periimplantar é menos organizado no combate à progressão de lesões associadas à placa bacteriana, resultando em um infiltrado inflamatório mais amplo e com uma lesão de maior extensão apical, quando comparado ao tecido gengival (LEONHARDT et al., 2003). Estas diferenças, na inserção dos dentes e implantes, podem caracterizar uma importante diferença no processo inflamatório frente a doença, a qual pode apresentar uma progressão mais rápida e severa da doença nos tecidos periimplantares.

A resposta inflamatória estimulada pela infecção bacteriana resulta na produção de mediadores inflamatórios como a citocina interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DINARELLO, 1994; GEIVELIS et al., 1993; GEMMELL et al., 1997; MOGI et al., 1999).

A IL-1 foi uma das primeiras citocinas descritas e amplamente estudada. Possui capacidade de causar febre, estimular proteínas hepáticas de fase aguda, aumentar a resposta linfocitária, induzir alterações degenerativas nas articulações e aumentar a quantidade de células da medula óssea (DINARELLO, 1994). A família da IL-1 é

composta por três polipeptídios, interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β) e antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1Ra). As interleucinas são primeiramente produzidas na forma precursora inativa ou parcialmente ativa. A pró-IL-1 β não apresenta atividade biológica, necessitando ser clivada em um peptídeo de 17KDa que apresenta atividade biológica ótima (DINARELLO,1994; NICKLIN et al., 2002).

A IL-1 β , um importante mediador do processo inflamatório, é secretada no fluido crevicular gengival primeiramente por macrófagos e monócitos, e pode também ser secretada posteriormente por leucócitos e células do epitélio juncional (GEMMELL et al., 1997; PAGE, 1991). Esta citocina está relacionada às fases aguda e crônica da doença (NICKLIN et al., 2002), e tem especial importância nas infecções bacterianas Gram-negativas, como a periodontite. A IL-1 β é um mediador químico ativado por lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular e metabólitos bacterianos (PAGE, 1991; GONZÁLES et al., 2001; JOHNSON et al., 1997; FENTON et al., 1988). Apresenta atividade catabólica de destruição óssea, contribuindo para a ativação de osteoclastos (NEMETZ et al., 2001), assim como atividades biológicas relacionadas ao seu papel de destruição tecidual na doença periodontal. Estas atividades incluem inibição de formação óssea, estimulação da síntese de prostaglandinas, tromboxanos, collagenases e proteases, potencialização da degranulação de neutrófilos, produção de superóxido, aumento da adesão leucocitária

de células endoteliais e estímulo da proliferação de fibroblastos e queratinócitos (STAKENKO et al., 1991).

Nos últimos anos estudos buscam elucidar a correlação entre as condições clínicas dos implantes osseointegrados, com a concentração da IL-1 β no fluido crevicular gengival.

Kao et al. (1995), Panagakos et al. (1996) e Murata et al (2002), demonstraram que a concentração de IL-1 β no fluido crevicular periimplantar, está aumentada na condição de doença, quando comparada à saúde periimplantar. A observação de que a concentração da IL-1 β no fluido crevicular gengival aumenta de acordo com o grau de severidade da doença (saúde, mucosite e periimplantite), sugere que esta citocina está relacionada à rápida e ampla destruição do tecido de suporte observado durante o processo de doença (PANAGAKOS et al., 1996), como também proporcionar um indicador para o monitoramento da saúde/doença em implantes osseointegrados (KAO et al., 1995). Ataoglu et al. (2002) avaliaram a concentração de IL-1 β no fluido crevicular periimplantar de pacientes fumantes e não fumantes que apresentavam implantes em condições satisfatórias. Os autores demonstraram que a concentração de IL-1 β detectada em pacientes fumantes, é inferior que a de pacientes não fumantes e também sugerem que o monitoramento da concentração de IL-1 β presente no fluido crevicular periimplantar pode auxiliar no diagnóstico de saúde periimplantar em pacientes não fumantes.

Os implantes osseointegrados, por não serem fisiologicamente inertes, estimulam células do sangue periférico a produzir IL-1 β e outros mediadores inflamatórios que podem levar à falência do implante (PERALA et al., 1992; KAO et al., 1995). No entanto, diferenças individuais na resposta inflamatória e imunológica à infecção bacteriana podem influenciar a suscetibilidade do hospedeiro à doença (PAGE et al., 1997). A cascata de mediadores inflamatórios do hospedeiro em resposta à infecção bacteriana, que pode resultar em destruição de tecido conjuntivo e ósseo, é determinada por fatores genéticos (NARES, 2003). Variações no genoma podem ocorrer como polimorfismos. Os polimorfismos genéticos são caracterizados por variações na sequência de nucleotídeos em uma posição específica do DNA e estão presentes em pelo menos 1% da população. Algumas variações do genoma ocorrem como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP – single nucleotide polymorphism). SNP é considerado a marca genética mais comum no genoma humano e é caracterizado pela alteração de um único par de base na sequência do gene. Desta forma, um SNP define dois alelos, e consequentemente três possíveis genótipos em uma população (TAYLOR et al., 2004). No genoma o SNP pode aparecer a cada 100 – 1000pb, como resultado de uma mutação por deleção, inserção ou substituição (SCHORK et al., 2000; CHEUNG e SPIELMAN, 2002; NARES, 2003). Os SNPs podem ser encontrados em exons, introns, regiões intergênicas, promotores e enhacer (SCHORK et al., 2000). Quando ocorrem na região

promotora ou no enhancer podem modificar a expressão do gene, e quando ocorrem no exon podem alterar a seqüência protéica e influenciar sua função biológica (TAYLOR et al., 2004).

Os genes das citocinas têm significativo papel no controle dos mecanismos da resposta imune por isso, os SNPs destes genes vem sendo amplamente estudados (TAYLOR et al., 2004). A citocina IL-1 β é codificada pelo gene IL-1B que está localizado no braço longo do cromossomo 2 (SHIMPUKU et al., 2003). Polimorfismos presentes neste gene podem influenciar a produção da IL-1 β in vivo (WARLÉ et al., 2003) e in vitro (KORNMAN e di GIOVINE., 1998). O gene IL-1B possui dois SNP em sua região promotora, IL-1B -31 (TAYLOR et al., 2004) e IL-1B -511 (di GIOVINE et al., 1992) e um SNP no exon 5, IL-1B +3954 (GUASCH et al., 1996). O polimorfismo IL-1B +3954 parece ter maior influência na expressão do gene, levando a níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular (ROGERS et al., 2002). A presença do alelo T no locus +3954 do gene IL-1B é mais freqüente em pacientes periodontalmente comprometidos, quando comparada aos controles saudáveis (ROGERS et al., 2002).

Kornman et al. (1997) demonstraram que os maiores níveis de IL-1 β estão relacionados ao alelo T (TT + TC – genótipo positivo) em pacientes não fumantes com doença periodontal, e que em pacientes fumantes a severidade da doença não pode ser correlacionada ao genótipo. Por outro lado, Feloutzis et al. (2003) encontraram maiores perdas ósseas em

pacientes fumantes pesados, com genótipo positivo, o que pode ser um indicativo de maior risco à perda óssea periimplantar. Da mesma maneira, Gruica et al. (2004) encontraram uma clara correlação entre o genótipo positivo e paciente fumante pesado, dos quais 50% apresentaram falência de implante ou complicações biológicas, podendo haver um efeito somatório entre o genótipo IL-1B positivo e o hábito de fumar.

Desta forma, o estudo do polimorfismo genético do gene IL-1B +3954, correlacionado à quantificação da concentração da citocina IL-1 β no fluido crevicular periimplantar, torna-se interessante no entendimento do fator genético frente à produção da citocina em pacientes com implante osseointegrados.

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de IL-1 β presentes no fluido crevicular periimplantar e o polimorfismo do nucleotídeo +3954 do gene IL-1B em pacientes com prótese sobre implante sob função a pelo menos um ano.

3 Material e método

3.1 Seleção da amostra

A população avaliada neste estudo foi composta por 20 indivíduos desdentados parciais, entre 26 e 71 anos, de ambos os sexos, selecionados na Clínica de Especialização em Implantodontia - FOAr. Os pacientes deveriam apresentar implantes com a prótese definitiva, implanto-suportada, por no mínimo um ano.

Os pacientes deveriam apresentar boas condições de saúde, com história médica negativa para doenças crônicas como as cardiovasculares, hepatite, febre reumática, asma, diabetes, desordens imunes e sangüíneas, história negativa de antibioticoterapia ou uso de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos 6 meses antecedentes ao estudo. Ainda, foram excluídos pacientes fumantes, mulheres grávidas ou lactantes. As próteses sobre implantes parafusadas deveriam ter ausência de quebra ou soltura do parafuso e as cimentadas não poderiam estar soltas e, os implantes deveriam apresentar profundidade sondagem até 3mm, e não deveriam ter supuração, mobilidade e/ou evidência de perda óssea radiográfica.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Todos os participantes foram esclarecidos sobre os propósitos do estudo e confirmaram sua aceitação mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Para os exames realizados,

foi também selecionado o dente homólogo ao implante, para controle. No caso do dente homólogo estar com evidências clínicas de doença periodontal, estar ausente ou estar restaurado, o dente saudável mais próximo ao homólogo foi selecionado.

3.2 Procedimentos Clínicos

O exame clínico foi realizado, por um único examinador, tanto nos implantes quanto em um dente do paciente, com a utilização da sonda periodontal Plástica Colorvue PCVNCKIT6 (Hu-Friedy Mfg. Inc – Chicago, IL- EUA). Uma ficha clínica específica (Anexo 2) foi utilizada para anotação dos seguintes parâmetros:

- ❖ índice de placa dicotomizado (Ainamo & Bay, 1975);
- ❖ índice de sangramento marginal modificado (Mombelli & Lang, 1994);
- ❖ sangramento à sondagem;

As análises foram realizadas em seis pontos (sítios) por implante/dente. O sítio com maior profundidade de sondagem foi selecionado para coleta do fluido crevicular.

3.3 Coleta do fluido crevicular

A coleta do fluido crevicular foi realizada uma semana após os exames clínicos para evitar interferência devido à sondagem.

O sítio a ser coletado foi isolado com roletes de algodão ou gaze estéril e a placa supragengival removida. A região foi seca com jato de ar e após 30 segundos o fluido crevicular gengival e periimplantar foram coletados. O fluido foi coletado utilizando-se fitas de papel absorvente – Periopaper (Oraflow Inc.) - que foram introduzidos na bolsa gengival/periimplantar, em direção apical, até sentir resistência, permanecendo então no local por 30 segundos. Os papéis visualmente contaminados com saliva e/ou sangue foram descartados. O volume de fluido coletado foi mensurado imediatamente após a coleta com o auxílio do Periotron 6000 (Oraflow Inc.).

As amostras foram armazenadas em tubos apropriados contendo uma solução de tampão fosfato salina (PBS– NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4) adicionado de albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL), antipaína (1μg/mL), aprotinina (1μg/mL), leupeptina (1μg/mL), N-ethylmaleimida (1mM) e N-Dodecyl-N, N-Dimethyl-3-Ammonio-1-propanesulfonato (50μg/mL) (Johnson et al., 1997) e então congeladas à uma temperatura de -20°C para posterior análise.

3.4 Coleta de células da mucosa bucal

Células epiteliais da mucosa bucal foram utilizadas para extração do DNA dos indivíduos. As células foram obtidas a partir de bochecho por 1 minuto com solução de glicose a 3%, e seguido de um raspado da mucosa bucal com uma espátula de madeira estéril. A espátula foi agitada no tubo contendo o bochecho e este centrifugado a 2.000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em tampão de extração (Tris 10mM, pH7,8; EDTA 5mM; SDS 0,5%), e congeladas a - 20°C para posterior análise (TREVILATTO e LINE, 2000).

3.5 Avaliação da concentração de IL-1 β no fluido crevicular

As amostras do fluido coletado foram descongeladas e agitadas em vortex. A quantificação da IL-1 β foi realizada utilizando-se um kit enzimático para imunensaio (ELISA) específico para interleucina humana (Hu IL-1 β - BioSource International) e o teste realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, 50 μ L das amostras do fluido crevicular foram colocados nos poços da placa de ELISA e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a biotina. Após incubação de 2 horas a placa foi lavada e a estreptoavidina-peroxidase foi adicionada aos poços.

A placa foi, então, incubada por 30 minutos e novamente lavada. O revelador foi adicionado aos poços e a placa novamente incubada. A solução bloqueadora foi adicionada e a absorbância a 450_{nm} aferida. As concentrações da IL-1 β determinadas pelo kit foram normalizadas para o volume de fluido crevicular coletado.

3.6 Avaliação do polimorfismo IL-1B +3954

As amostras contendo células da mucosa bucal foram descongeladas e incubadas durante uma noite com 100ng/mL de proteinase K (Invitrogen) a 37°C. O DNA foi então purificado utilizando-se a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), seguido da precipitação com sal/etanol. O DNA foi ressuspendido em 70 μ L de tampão TE (Tris 10mM (pH 8,0), EDTA 1mM). A concentração do DNA foi estimada com o auxílio de um espectofotômetro (DU Spectrophotometer) em comprimento de onda de 260nm.

O DNA extraído das células de bochecho foi utilizado como molde, em uma reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (GeneAmp®PCR System 9700) utilizando os seguintes oligonucleotídeos específicos (Kornman et al., 1997):

5' - CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA - 3'

5' - GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG – 3'

A reação de PCR foi realizada em volume final de 50µL, contendo aproximadamente 700ng de DNA genômico, 1µM de cada oligonucleotídeo (Invitrogen), 200µM de dNTPs (Invitrogen) e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram incubadas a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 67,5°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 10 minutos, conforme descrito por Kornman et al. (1997). A amplificação do fragmento 194 pares de bases (pb) e foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração de prata (Figura 1).

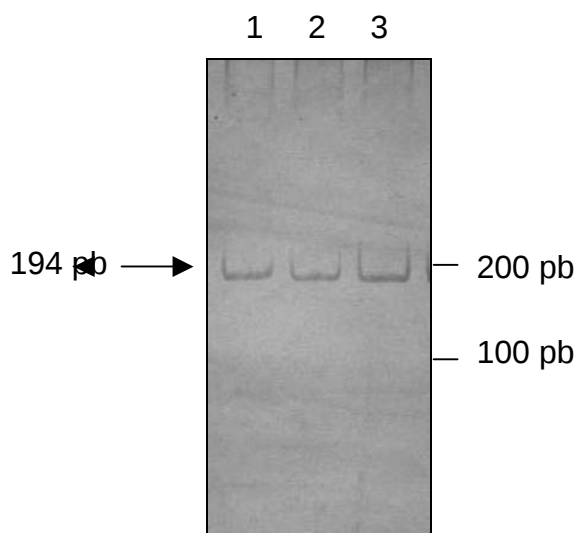


FIGURA 1 - Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, evidenciando os produtos de PCR. Canaletas 1 a 3

representam o produto de PCR amplificado do DNA em 3 pacientes.

A técnica de polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) utiliza as alterações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA que criam ou destroem sítios para endonucleases de restrição para identificar os diferentes alelos. A enzima de restrição Taq I, 2 unidades, (New England BioLabs) foi utilizada para a digestão dos produtos de PCR, durante uma noite, a 67°C. O produto total do PCR/RFLP (18µL) foi adicionado de 2 µL de tampão de amostra e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Para a visualização dos fragmentos de restrição o gel foi corado com nitrato de prata. Esta análise de restrição apresenta o seguinte padrão de bandas:

alelo C= 12pb+85pb+97pb

alelo T= 12pb+182pb

3.7 Coloração por nitrato de prata

O gel foi submerso durante 10 minutos em solução fixadora (metanol 40%; formaldeído 13,5%) e lavado duas vezes, durante 5 minutos cada lado, com água. Em seguida o gel foi submerso em solução de tiosulfato 0,02% durante um minuto, e lavado duas vezes com água, por 20

segundos. O gel foi impregnado em solução de nitrato de prata 0,1% por um período de 10 minutos, e terminada a impregnação, foi enxaguado uma vez com água e uma vez com solução reveladora (Na_2CO_3 3%, formaldeído 0.05%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 00,16 $\mu\text{g/mL}$). O gel foi deixado na solução reveladora até que as bandas pudessem ser visualizadas. A reação foi então parada com uma solução de ácido cítrico 2,3 M.

4 Resultado

4.1 Análise dos indivíduos e implantes

Foi selecionado um total de 20 pacientes, dos quais 12 (60%) são do gênero feminino e 8 (40%) são o gênero masculino. A idade média dos pacientes é de 46,1 anos, sendo que a idade média para os pacientes do gênero feminino é de 46,58 anos, e para os pacientes do gênero masculino a idade média é de 51 anos (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição de gênero e idade média dos pacientes estudados

Gênero	Nº de pacientes (%)	Idade média
Feminino	12 (60%)	46,58
Masculino	8 (40%)	51,00
<i>Total</i>	20 (100%)	46,10

Foi avaliado um total de 25 implantes, dos quais 8 estavam em região anterior de maxila, 9 na região posterior de maxila, 1 na região anterior de mandíbula e 7 na região posterior de mandíbula (Tabela 2). Todos os implantes avaliados foram classificados como saudáveis uma

vez que não apresentavam características de dor, mobilidade, supuração ou evidência de perda óssea radiográfica. O exame clínico foi realizado em 150 sítios periimplantares e destes, 124 (82,6%) estavam ausentes de placa visível, 135 (90%) não apresentaram sangramento marginal, 137 (91,3%) não apresentaram sangramento a sondagem e todos os 150 (100%) sítios não apresentaram supuração (Tabela 3).

Tabela 2- Distribuição dos implantes nas arcadas

Implantes avaliados	Maxila		Mandíbula	
	anterior	posterior	anterior	posterior
25	8 (32%)	9 (36%)	1 (4%)	7 (28%)

Tabela 3- Condições clínicas dos sítios periimplantares avaliados

Sítios Periimplantares(n=150)	Presença de Placa	Sangramento marginal	Sangramento à Sondagem
Presente	26(17,4%)	15(10%)	13(8,7%)
Ausente	124(82,6%)	135(90%)	137 (91,3%)

Também foram avaliados 120 sítios periodontais, correspondente a um dente por indivíduo. Dos sítios periodontais avaliados, 98 (81,6%) estavam ausentes de placa visível, 116 (96,6%) não apresentaram sangramento marginal, e 117 (97,5%) não apresentavam sangramento à sondagem e todos os 120 sítios estavam ausentes de supuração (Tabela 4).

Tabela 4- Condições clínicas dos sítios periodontais avaliados

Sítios Periodontais (n=120)	Presença de Placa	Sangramento marginal	Sangramento à Sondagem
Presente	22(18,4%)	4(3,4%)	3(2,5%)
Ausente	98(81,6%)	116(96,6%)	117(97,5%)

4.2 Análise da concentração de IL-1 β no fluido crevicular gengival e periimplantar.

Para a quantificação da IL-1 β utilizamos um Kit enzimático para imunoenensaio (ELISA) específico para interleucina humana (Hu IL-1 β -BioSource International, Inc.). As amostras do fluido crevicular analisadas

neste estudo não continham IL-1 β ou possuíam quantidade inferior ao limite de detecção do Kit utilizado, ou seja, inferior a 1 ng/ μ L.

4.3 Análise do polimorfismo do gene IL-1B +3954.

Os três genótipos possíveis, homozigoto para o alelo C (genótipo C/C), homozigoto para o alelo T (genótipo T/T) ou heterozigoto (genótipo C/T), foram identificados por PCR/RFLP em gel de poliacrilamida 8%. Os pacientes homozigotos para o alelo T (Figura 2 – canaleta 1) apresentam fragmento de restrição de 182pb, os homozigotos para o alelo C apresentam de 85pb e 97pb (Figura 2 – canaleta 2) e os heterozigotos apresentam fragmentos de 85pb e 97pb e 182pb.

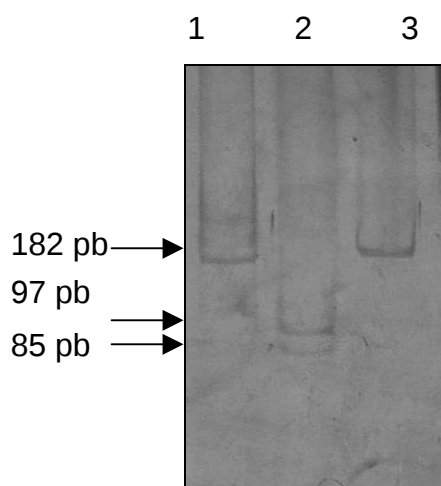


FIGURA 2- Gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, evidenciando a genotipagem por PCR/RFLP. Canaletas 1 e 2 apresentam o resultado da digestão com Taq I de dois

pacientes. A canaleta 3 apresenta o controle do produto de PCR não digerido.

As distribuições alélicas e genotípicas foram calculadas e podem ser observadas nas Tabelas 5 e 6 respectivamente. Nos indivíduos investigados foi observada maior frequência do alelo C (85%) e menor frequência do alelo T (15%). Na observação do genótipo, houve predominância do genótipo homozigoto para o alelo C, o qual ocorreu em 15 pacientes (75%) da população avaliada, ao contrário do genótipo homozigoto para o alelo T que foi observado em apenas um indivíduo da população analisada (5%) e do heterozigoto C/T presente em 4 (20%) pacientes.

Tabela 5- Distribuição dos alelos

	Total (n=40)
Alelo C	34 (85 %)
<i>Alelo T</i>	6 (15 %)

Tabela 6- Distribuição dos genótipos

	Pacientes (n=20)
Genótipo C/C	15 (75%)
Genótipo T/T	1 (5%)
Genótipo C/T	04 (20 %)

Analisando os dados dos 15 pacientes homozigotos para o alelo C temos um total de 19 implantes, 114 sítios avaliados. Destes sítios, verificamos que 92 (80,7%) estavam ausentes de placa, 99 (86,85%) não apresentavam sangramento marginal e 102 (89,47%) não sangravam a sondagem Tabela 7).

**Tabela 7- Condições clínicas dos implantes dos pacientes
homozigotos para o alelo C**

Sítios Periimplantares(n=114)	Presença de Placa	Sangramento marginal	Sangramento à Sondagem
Presente	22 (19,3%)	15 (13,15%)	12 (10,53%)
Ausente	92 (80,7%)	99 (86,85%)	102 (89,47%)

Analisando os dados dos 5 pacientes que apresentavam em seu genótipo o alelo T, inclui-se a avaliação de 6 implantes, ou seja, 36 sítios, Observamos que em 29 sítios (80,5%) havia ausência de placa, 36 (100%) não apresentavam sangramento marginal e 35 (97,22%) não sangravam à sondagem (Tabela 8).

Tabela 8- Condições clínicas dos implantes dos pacientes sua apresentavam o alelo C

Sítios Periimplantares(n=36)	Presença de Placa	Índice Gengival	Sangramento à Sondagem
Presente	7 (19,5)	0 (0%)	1 (2,78%)
Ausente	29 (80,5%)	36 (100%)	35 (97,22%)

5 Discussão

Este estudo procurou verificar a existência de uma relação entre o polimorfismo do gene IL-1B +3954, com os níveis de IL-1 β presentes no fluido crevicular periimplantar de pacientes com prótese sobre implante em função há pelo menos um ano.

Uma vez que os implantes e dentes avaliados apresentavam condições clínicas favoráveis, não foi observada supuração em nenhum dos sítios. Por outro lado, pudemos observar que 26 (17,4%) sítios periimplantares e 22 (18,4%) sítios periodontais apresentavam placa bacteriana supragengival. A persistência do acúmulo desta placa bacteriana pode levar a um aumento na quantidade de placa e, conseqüentemente uma mudança na microbiota da placa subgengival (SCHOU et al., 1992, 1996), tornando esta altamente patogênica ao desenvolvimento de doença. O sangramento marginal, que representa a inflamação marginal devido ao acúmulo de placa supragengival, estava presente em 13 (8,7%) dos sítios periimplantares avaliados e em 4 (3,4%) dos sítios periodontais. De maneira semelhante, o sangramento à sondagem, foi observado em 13 (8,7%) dos sítios periimplantares avaliados e em 3 (2,5%) dos sítios periodontais. Diante destes achados, observamos que o sangramento marginal e à sondagem nos sítios periimplantares são equivalentes.

Mesmo em condições clinicamente saudáveis, é possível detectar, nos tecidos, citocinas e células contendo citocinas, pois usualmente é encontrado um pequeno número de células inflamatórias crônicas em tecido gengival sadio (STAKENKO et al., 1991). Desta forma, foi estabelecido por Alexander et al. (1996), como demonstrativo de doença periodontal ativa, uma concentração de ≥ 70 pg/ μ L de IL-1 β no fluido crevicular.

Neste estudo não foi possível detectar IL-1 β no fluido crevicular dos sítios avaliados. A IL-1 β é um mediador inflamatório sistêmico, que pode ser detectado no fluido de pacientes sistemicamente comprometidos por doenças de caráter inflamatório. Uma vez que a seleção da amostra foi bastante criteriosa em relação à inclusão dos pacientes no estudo, acredita-se que não há fatores sistêmicos que possam contribuir para a produção de IL-1 β . As condições satisfatórias dos implantes avaliados também não levam a produção de IL-1 β nestes pacientes e assim esta citocina não foi detectada nos fluidos avaliados. Por outro lado, Panagakos et al. (1996) buscaram correlacionar a concentração de IL-1 β não apenas aos implantes sadios, mas naqueles que se apresentassem acometidos pela periimplantite. Os autores demonstraram que mesmo nos implantes clinicamente sadios, embora em pequenas concentrações (59.47 ± 15.55 pg/sítio), a IL-1 β é detectada no fluido crevicular. Da mesma maneira, Kao et al. (1995) detectaram maiores concentrações de IL-1 β no fluido crevicular de implantes acometidos pela periimplantite (385.95

pg/ μ L) quando comparados a implantes sadios (120.4, pg/ μ L) de maneira que a concentração de IL-1 β nos sítios doentes é aproximadamente três vezes maior, mostrando uma maior especificidade à atividade de doença e podendo ser um indicativo para o monitoramento da doença. Murata et al. (2002), utilizaram como controle a coleta do fluido crevicular de dentes saudáveis. Porém em contradição aos nossos achados, no qual não foi detectado IL-1 β , estes autores encontraram uma concentração de 36.35 ± 27.38 pg/ μ L de IL-1 β no fluido crevicular gengival coletado, e uma concentração de 23.87 ± 23.35 pg/ μ L de IL-1 β no fluido crevicular periimplantar de implantes sadios. Em concordância, a IL-1 β pode ser detectada em sítios periodontais clinicamente sadios (ALEXANDER et al. 1996), porém estes autores avaliaram as concentrações de IL-1 β em pacientes que receberam tratamento periodontal e não encontraram mudanças significativas na concentração de IL-1 β antes da fase de manutenção, uma vez que nesta fase os pacientes apresentavam controle de placa adequado.

A produção da IL-1 β é regulada por fatores genéticos. A presença de SNPs no gene IL-1B pode alterar a expressão do genética da citocina levando a níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular. A presença do alelo T no locus +3954 do gene IL-1B é menos freqüente e pode estar relacionada a maior severidade de doença (NARES, 2003).

Em concordância com essa afirmativa, neste estudo o alelo T foi o menos freqüente. De todos os alelos estudados, 34 (85 %) eram o alelo C enquanto que apenas 6 (15 %) foram o alelo T. O genótipo observado com maior freqüência foi o genótipo homozigoto para o alelo C (75 % dos pacientes) Desses pacientes foram avaliados 114 sítios em 19 implantes. Pudemos observar ausência de placa em 92 (80,7%), ausência de sangramento marginal em 99 (86,85%) e ausência de sangramento a sondagem em 102 (89,47%). Considerando os 5 pacientes que apresentavam o alelo T (25%) em seu genótipo, 4 (20%) eram heterozigotos para o alelo T e 1 homozigoto), foram avaliados 36 sítios em 6 implantes. Dos sítios avaliados, 29 (80,5%) não apresentavam placa, nenhum (100%) sítio apresentou sangramento marginal e 35 (97,22%) não sangraram a sondagem.

Sendo a placa bacteriana o fator etiológico primário ao desenvolvimento da periimplantite, um monitoramento do controle de placa bacteriana mais rigoroso nos pacientes que apresentam em seu genótipo o alelo T, pode ser interessante uma vez que estes pacientes podem ter um desenvolvimento mais severo da doença, uma vez que ela ocorra.

Shimpuku et al. (2003) avaliaram o polimorfismo genético para a IL-1, em implantes com perda óssea precoce e idiopática e compararam a

controles sem perda óssea. Os autores não encontraram diferenças na distribuição dos genótipos para IL-1B +3954 entre os grupos avaliados.

De forma semelhante, Campos et al. (2005) buscaram correlacionar o polimorfismo genético da IL-1 β com a perda precoce de implantes osseointegrados, em pacientes não fumantes, e não encontraram associação deste tipo de perda com a presença do alelo T no gene IL-1B +3954.

Outros estudos encontrados na literatura (FELOUTZIS et al., 2003; GRUICA et al., 2004), buscaram a influência do alelo T com a perda óssea, de maneira que este alelo foi correlacionado a destruição óssea e a condição de doença em implantes osseointegrados.

Feloutzis et al. (2003) encontraram uma correlação entre perda óssea e a presença do alelo T, denominados genótipo positivo. No entanto, estes autores avaliaram a perda óssea em pacientes fumantes, os quais foram divididos em fumantes pesados, fumantes moderados, ex-fumantes e pacientes que nunca fumaram. Os pacientes fumantes pesados, com genótipo positivo apresentaram maiores perdas ósseas ao redor dos implantes osseointegrados. Em conformidade com estes achados, Gruica et al. (2004) correlacionaram a perda óssea em implantes, de pacientes fumantes pesados, com a presença do alelo T. Diante destes achados, os autores acreditam que há um efeito somatório entre a presença do alelo T para IL-1 e o hábito de fumar.

A ocorrência do alelo T é rara e está relacionada a severidade de doença, neste estudo encontramos apenas um paciente homozigoto para o alelo T. Como todos os pacientes selecionados apresentavam implantes em condições clínicas satisfatórias não foi possível avaliar uma relação entre o genótipo e maior severidade de doença. Portanto, torna-se interessante trabalharmos com um de pacientes com implantes clinicamente sadios e um grupo de pacientes com implantes acometidos pela periimplantite, de maneira que possamos avaliar a condição de doença em relação ao genótipo estudado. Em complementaridade, nos pacientes com doença teríamos um maior volume de fluido crevicular periimplantar, com concentrações mais elevadas de citocinas inflamatórias e então, talvez, pudéssemos encontrar uma relação entre o genótipo e a concentração de citocina no fluido crevicular, na condição de doença.

Desta forma, para uma melhor elucidação da correlação da citocina IL-1 β no fluido crevicular periimplantar e do polimorfismo IL-1B +3954, estudos que busquem avaliar um maior número de pacientes, assim como diferentes condições clínicas dos implantes osseointegrados, devem ser realizados.

6 Conclusão

Dentro dos limites deste estudo e com base nos resultados, podemos concluir que em implantes osseointegrados clinicamente saudáveis:

- A citocina IL-1 β não é encontrada no fluido crevicular periimplantar.
- O genótipo mais freqüente é o homozigoto para o alelo C
- O genótipo homozigoto para o alelo C não leva a um aumento na concentração de IL-1 β no fluido crevicular.

7 Referências*

1. ADELL, J.C. et al. A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v.6, n.6, p.387-399, Dec. 1981.
2. AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v.25, n.4, p.229-235, Dec. 1975.
3. ALEXANDER, D. C. C. et al. Interleukin-1 beta, prostaglandin E₂, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. **J. Periodontol.**, Chicago, v.67, n.8, p.755-762, Aug. 1996.
4. ATAOGU, H. et al. Interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α levels and neutrophil elastase activity in peri-implant crevicular fluid. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.13, n.15, p. 470-476, Oct. 2002.
5. BERGLUNDH, T. et al. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.1-8, Mar. 1992.
6. CAMPOS, M.I.G. et al. Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002.24.

- in non-smoking patients. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.16, n.2, p.194-201, Apr. 2005.
7. CHEUNG, V.G.; Spielman, R.S. The genetic of variation in gene expression. **Nat. Genet.**, New York, v.32, p.522-525, Dec. 2002.
 8. DINARELLO, C.A. The interleukin 1 family: 10 years of discovery. **FASEB J.**, Bethesda, v.8, n.15, p. 1314-1325, Dec. 1994.
 9. ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures osseointegrated oral implants. Part I. Success criteris and epidemiology. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.106, n.1, p.527-551, Feb. 1998a.
 10. ESPOSITO, M. et al. Biologycal factors to failures osseointegrated oral implants. Part II. Etiopathogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.106, n.3 p.721-764, June 1998b.
 11. FELOUTZIS, A. et al. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in well-maintained population. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.14, n.1, p.10-17, Feb. 2003.
 12. FENTON, M. J. et al. Human Pro-IL-1 β gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. **J. Immunol.**, Baltimore, v.140, n.7, p.2267-2273, Apr. 1988.
 13. GEIVELIS, M. et al. Measurements of interleukin 6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n.10, p.980-983, Oct. 1993.

14. GEMMELL, E. et al. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Chicago, v.14, n.1, p.112-143, June 1997.
15. di GIOVINE, F. S. et al. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 β gene. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.1, n.6, p.450, Sept. 1992.
16. GONZÁLES, J.R. et al. Concentration of interleukin - 1 β and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. **J. Clin. Periodontol**, Copenhagen, v.28, n.6, p.544-549, June 2001.
17. GRUICA, B. et al. Impact of IL-1 gene genotype and smoking on prognosis of osseointegrated implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.15, n.4, p. 393-400, Aug. 2004.
18. GUASH, J. F. et al. Five novel intragenic in the human interleukin 1 genes combine to high informativity. **Cytokine**, Philadelphia, v.8, n.8, p.598-602, Aug. 1996.
19. HANISCH, O. et al. Experimental peri-implant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.1, p.59-66, Jan. 1997.
20. JOHNSON, T. C. et al. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. **J. Clin. Periodontol**, Copenhagen, v.24, n.9 p.618-625, Sept. 1997.

- 21.KAO, R. T. et al. Increased interleukin-1 β in the crevicular fluid of diseased implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.6, p.696-701, Nov/Dec. 1995.
- 22.KORNMAN, K.S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.1, p.72-77, Jan. 1997.
- 23.KORNMAN, K.S.; di GIOVINE, F.S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.3, n.1, p.327-338, July 1998.
- 24.LEONHARDT, A. et al. Microbial findings at failing implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.10, n.5, p.339-345, Oct. 1999.
- 25.LEONHARDT, A. et al. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.10, p.1415-1422, Oct. 2003.
- 26.LINDHE, J. et al. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.9-16, Mar. 1992.
- 27.LINDQUIST, L. W. et al. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, n.4, p.329-336, Dec. 1996.

28. LISTGARTEN, M. A. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.15, n.8, p.485-487, Sept. 1988.
29. LISTGARTEN, M. A.; LAI C. H. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. **J. Periodontol.**, Chicago, v.70, n.4, p.431-437, Apr. 1999.
30. LÖE, H. et al. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Chicago, v.36, n.3, p.177-187, May/June 1965.
31. MOGI, M. et al. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.44, n.6, p.535-539, June 1999.
32. MOMBELLI, A. et al. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.2, n.4, p.145-151, Dec. 1987.
33. MOMBELLI, A.; LANG, N.P. Microbial aspects of implant dentistry. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.4, n.1, p.74-80, Dec. 1994.
34. MURATA, M. et al. Osteoclastin, deoxypyridinoline and interleukin 1 β in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.13, n.6, p.637-643, Dec. 2002.
35. NARES, S. The genetic relationship to periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.32, n.1, p.36-49, June 2003.

36. NEMETZ, A. et al. Allelic variation at the interleukin 1 β gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel disease. **Gut.**, London, v.49, n.5, p.644-649, Nov. 2001.
37. NICKLIN, M. J. H. et al. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. **Genomics**, San Diego, v.79, n.5, p.718-725, May 2002.
38. PAGE, R. C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.26, n.3pt.2, p.230-242, May 1991.
39. PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.14, n.1, p.216-48, June 1997.
40. PANAGAKOS, F.S. et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.11, n.6, p.794-799, Nov/Dec. 1996.
41. PERALA, D. G. et al. Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.5, p.426-30, May 1992.
42. ROGERS, M. A. et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or success of dental implants? **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.37, n.1, p.37-41, Feb. 2002.

43. RUTAR, A. et al. Retrospective assessments of clinical and microbiological factors affecting periimplant tissue conditions. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.12, n.3, p.189-195, June 2001.
44. SCHORK N. J. et al. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clin. Genet.**, Copenhagen, v.58, n.4, p.250-264, Oct. 2000.
45. SCHOU, S. et al. Plaque-induced marginal tissue reactions of osseointegrated oral implants: a review of the literature. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.3, n.4, p.149-161, Dec. 1992.
46. SCHOU, S. et al. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, n.3, p.190-200, Sept. 1996.
47. SHIMPUKU, H. et al, 2003. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.14, n.4, p.423-429, Aug. 2003.
48. STAKENKO, P. et al. Levels of interleukin 1 β in tissue from sites of active periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.18, n.7, p.548-554, Aug. 1991.
49. TAYLOR, J. J. et al. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v.35, n.1, p.158-182, June 2004.

50. TREVILATTO, P. C.; LINE, S.R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **J. Forensic Odontostomatol.**, v.18, n.1, p.6-9, June 2002.
51. WARLÉ, M. C. et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? **Liver Transpl.**, Philadelphia, v.9, n.2, p. 170-181, Feb. 2003.

Anexo 1 - Aprovação do CEP e Termo de Consentimento

3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Por este instrumento particular, declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu, _____, (idade) _____, (Nacionalidade) _____, (Profissão) _____, portador do R.G. nº _____, Orgão Expedidor: _____, C.I.C. _____, residente e domiciliado à _____, nº _____, Bairro: _____, Cidade: _____, Estado _____, Tel: _____, fui esclarecido sobre todos os procedimentos aos quais serei submetido no projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE CLÍNICA, RADIOGRÁFICA, MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E GENÉTICA DE IMPLANTES OSSEINTEGRADOS SOB FUNÇÃO". Se acaso alguma dúvida me restar, a pesquisadora responsável, Dra. Rafaela Fernanda Melo, por esta pesquisa deverá esclarecê-la. Vou me submeter a pesquisa proposta, nos termos abaixo relacionados:

1. Fui informado estar participando de um projeto de pesquisa que tem por objetivo coletar dados clínicos, radiográficos, microbiológicos, imunológicos e genéticos para correlacioná-los e concluir em quais condições encontram-se os implantes que estão com a prótese instalada e sob função a pelo menos um ano;
2. Fui esclarecido que estarei passando por um exame clínico periodontal completo, assim como serão realizadas radiografias dos implantes. Também será realizada coleta de material (fluido crevicular), na região dos implantes, para análise microbiológica e imunológica. Ainda, será feito um raspado da mucosa da bochecha para que o exame genético possa ser executado;
3. Fui informado que os exames clínicos serão realizados com o auxílio de sonda periodontal plástica, os exames radiográficos com filmes para radiografias intra-oral, as coletas para os exames microbiológico e imunológico com papel absorvente e o coleta para o exame genético com espátula de madeira;
4. Estou ciente de que todos os exames realizados pelo pesquisador serão feitos com material adequadamente esterilizado, minimizando o meu risco de contaminação;
5. Fui esclarecido que os exames realizados clínica, radiográfica e com o material coletado será para avaliar o meu risco em desenvolver doença na região dos implantes;

Protocolo CEP nº 26/03

Aprovado em Reunião de

19/03/04

Secretaria do CEP - FO/CA

6. Estou ciente que o meu consentimento não exime a responsabilidade da pesquisadora responsável, a qual tem o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante a pesquisa;
7. Esclareço que minha adesão ao presente trabalho de pesquisa /tratamento foi voluntária, sem qualquer tipo de pressão ou coação por parte dos pesquisadores e pessoal de apoio;
8. Estou consciente de que deverei comparecer para exames inicial e após 6 meses para que os mesmos possam ser repetidos, sendo que se necessário deverei comparecer para que possa ser realizada uma raspagem periodontal / perimplantar;
9. Recebi explicações detalhadas da minha participação neste experimento, possuindo plena liberdade para me negar a participar da referida pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma, e tendo disponibilidade de tratamento odontológico e indenização a que tenho direito em casos de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa;
10. Autorizo, portanto, minha participação na pesquisa intitulada "Análise clínica, radiográfica, microbiológica, imunológica e genética de implantes orais osseointegrados sob função", concordando com a realização de fotografias, exames clínicos, radiográficos, microbiológicos, imunológicos e genético que permitam a observação das condições dos meus implantes, o qual poderá vir a ser utilizado com finalidades de material didático (dar aulas), e de divulgação em revistas científicas, brasileiras e estrangeiras;
11. Foi – me informado de que quando da divulgação e/ou publicação dos dados obtidos na presente investigação, estas serão informações CONFIDENCIAIS, guardadas por forma de sigilo profissional, sendo minha identidade preservada;
12. Foi – me informado os telefones dos membros da equipe para atendimento em eventual intercorrência odontológica: (16) 2356924 / (16) 97038504;
13. Todas essas normas estão de acordo com *Código Nacional de Saúde* , segundo a resolução CSN 1996/96;
14. Consta o telefone da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para recuso ou reclamações: (16) 2016432 ou (16) 2016434.

Rafaela F. Melo

Pesquisadora Responsável

Rafaela Fernanda Melo

Protocolo CEP nº 86/03

Aprovado em Reunião de

15/09/03

[Assinatura]

Secretaria do CEP-FO/CAE.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa



Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**ANÁLISE CLÍNICA, RADIOGRÁFICA, MICROBIOLÓGICA, IMUNOLÓGICA E GENÉTICA DE IMPLANTES ORAIS OSSEOINTEGRADOS SOB FUNÇÃO**", sob o protocolo nº 86/03, de responsabilidade do Pesquisador (a) **RAFAELA FERNANDA MELO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "**CLINICAL, RADIOGRAPHIC, MICROBIOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETICS ASSESSMENTS ON OSSEOINTEGRATED ORAL IMPLANTS**", protocol number 86/03, under Dr **RAFAELA FERNANDA MELO** responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 19 de março de 2004.

Profª Drª **Mirian Aparecida Onofre**
Coordenadora

Anexo 2 - Ficha clínica

Data: ____/____/200__.

Implante: _____

	MV	V	DV	ML	L	DL
IP						
IG						
PS						
NG						
SS						
SUP						

Dente: _____

	MV	V	DV	ML	L	DL
IP						
IG						
PS						
NG						
SS						
SUP						

MELO, R. F. **Análise da citocina IL-1 β e do polimorfismo do gene IL-1B +3954 em pacientes com implantes osseointegrados.** 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de interleucina-1 β (IL-1 β) e o polimorfismo na posição +3954 do gene IL-1B em pacientes com a prótese sobre implante, em função, a pelo menos um ano. Vinte e cinco implantes, clinicamente satisfatórios, foram avaliados, em vinte pacientes saudáveis, sendo doze do gênero feminino e oito masculino. Exame clínico completo foi feito em todos os implantes e em um dente em condição de saúde de cada paciente. Amostra do sítio com maior profundidade de sondagem foi coletada para a quantificação da concentração de IL-1 β no fluido crevicular periimplantar/gengival. Células da mucosa bucal foram coletadas para extração do DNA genômico e análise do polimorfismo IL-1B +3954. Não foi detectada a presença da citocina IL-1 β nos sítios avaliados. Na população estudada houve uma predominância do genótipo homozigoto para o alelo C, o qual esteve presente em 75% dos pacientes avaliados. O genótipo homozigoto para o alelo T foi encontrado em apenas um (5%) paciente. Neste estudo não observamos uma relação entre a presença do alelo T e níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular.

Palavras-chave: Fluido crevicular gengival; interleucina-1; polimorfismo (genética); implante dentário

MELO, R. F. **Evaluation of the cytokine IL-1 β and the polymorphism IL-1B +3954 in patients with osseointegrated implants.** 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

Abstract

The aim of the present study was to determine interleukin-1 β (IL-1 β) levels and the polymorphism IL-1B +3954 in patients with implant loaded at least for one year. Twenty five healthy implants from twelve patients, twenty female and eight male, were examined. Clinical parameters were recorded from all implants and one teeth from each patient. Gingival crevicular fluid from the highest pocket depth was collected, with PerioPaper, to evaluate the level of the IL-1 β . Cells from buccal mucosa were collected for genomic DNA extraction and analyze the polymorphism IL-1B +3954. IL-1 β was not detected in any sites collected. At the studied population we observed prevalence from negative genotype, present in 75% of patients. The positive genotype was observed only in one (5%) patient from the population. Negative genotype is associated with health implants, and are not related to elevated levels of IL-1 β on the crevicular fluid.

Keywords: gingival crevicular fluid; interleukin-1; polymorphism; genotype.

Análise da citocina IL-1 β e do polimorfismo do gene IL-1B +3954 em pacientes com implantes osseointegrados.

Evaluation of the cytokine IL-1 β an the polymorphism IL-1B +3954 in patients with osseointegrated implants.

Rafaela Fernanda Melo*

Aluna de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Elcio Mrcantonio Junior

Prof. Adjunto do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Rosemary Adriana C. Marcantonio

Prof^a. Adjunto do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Glória Maria Thompson Galli

Pós-doc no Curso de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de interleucina-1 β (IL-1 β) e o polimorfismo na posição +3954 do gene IL-1B em pacientes com prótese sobre implante, com carga mastigatória, a pelo menos um ano. Vinte e cinco implantes, clinicamente satisfatórios, foram avaliados, em vinte pacientes saudáveis, sendo doze do gênero feminino e oito masculino. Exame clínico periodontal completo foi feito em todos os implantes e em um dente, em condição de saúde, de cada paciente. Amostra do sítio com maior profundidade de sondagem foi coletada para a quantificação da concentração de IL-1 β no fluido crevicular periimplantar/gengival. Células da mucosa bucal foram coletadas para extração do DNA genômico e análise do polimorfismo na posição +3954 do gene IL-1B. Não foi detectada a presença da citocina IL-1 β nos sítios avaliados. Na população estudada houve uma predominância do genótipo homozigoto para o alelo C, o qual esteve presente em 75% dos pacientes avaliados. O genótipo homozigoto para o alelo T foi encontrado em apenas um (5%) paciente. Neste estudo não observamos o genótipo homozigoto para o alelo C não leva a um aumento na concentração de IL-1 β no fluido crevicular.

Palavras-chave: Fluido crevicular gengival; interleucina-1; polimorfismo (genética); implante dentário

INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegrados vêm sendo amplamente utilizados, com alto índice de sucesso, para a reabilitação oral (ADELL et al., 1981; LINDQUIST et al., 1996; MURATA et al., 2002) e tem sido uma alternativa preditiva à terapia protética convencional (HANISH et al., 1997). No entanto, a falência destes implantes devido à infecção bacteriana tem sido relatada por diversos estudos (ESPOSITO et al., 1998a,b; LEONHARDT et al., 1999; LINDHE et al., 1992; LISTGARTEN e LAI, 1999; SCHOU et al., 1996).

A resposta inflamatória estimulada pela infecção bacteriana resulta na produção de mediadores inflamatórios como a citocina interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DINARELLO, 1994; GEIVELIS et al., 1993; GEMMELL et al., 1997; MOGI et al., 1999). IL-1 β é um mediador químico ativado por lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular e metabólitos bacterianos (PAGE, 1991; GONZÁLES et al., 2001; JOHNSON et al.,

1997; FENTON et al., 1988). Apresenta atividade catabólica de destruição óssea, contribuindo para a ativação de osteoclastos (NEMETZ et al., 2001), assim como atividades biológicas relacionadas ao seu papel de destruição tecidual na doença periodontal. No entanto, diferenças individuais na resposta inflamatória e imunológica à infecção bacteriana podem afetar a suscetibilidade do hospedeiro à doença (PAGE et al., 1997).

Variações no genoma podem ocorrer como polimorfismo, caracterizado por variações na seqüência de nucleotídeos em uma posição específica do DNA. A citocina IL-1 β é codificada pelo gene IL-1B que está localizado no braço longo do cromossomo 2 (SHIMPUKU et al., 2003). Polimorfismos presentes neste gene podem influenciar a produção da IL-1 β in vivo (WARLÉ et al., 2003) e in vitro (KORNAMAM e di GIOVINE., 1998). O gene IL-1B possui dois SNP em sua região promotora, IL-1B -31 (TAYLOR et al., 2004) e IL-1B -511 (di GIOVINE et al., 1992) e um SNP no exon 5, IL-1B +3954 (GUASCH et al., 1996). O polimorfismo IL-1B +3954 parece ter maior influência na expressão do gene, levando a níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular (ROGERS et al., 2002). A presença do alelo T no gene IL-1B+3954 é mais freqüente em pacientes periodontalmente comprometidos, quando comparada aos controles saudáveis (ROGERS et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de IL-1 β presentes no fluido crevicular periimplantar e o polimorfismo do nucleotídeo +3954 do gene IL-1B em pacientes com prótese sobre implante sob função a pelo menos um ano.

METODOLOGIA

Seleção da amostra

A população avaliada neste estudo foi composta por 20 indivíduos desdentados parciais, entre 26 e 71 anos, de ambos os sexos, selecionados na Clínica de Especialização em Implantodontia - FOAr. Os pacientes deveriam apresentar implantes com a prótese definitiva, implanto-suportada, por no mínimo um ano.

Os pacientes deveriam apresentar boas condições de saúde, com história médica negativa para doenças crônicas como as cardiovasculares, hepatite, febre reumática, asma, diabetes, desordens imunes e sangüíneas, história negativa de antibioticoterapia ou uso de antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides nos 6 meses antecedentes ao estudo. Ainda, foram excluídos pacientes fumantes, mulheres grávidas ou lactantes. As próteses sobre implantes parafusadas deveriam ter ausência de quebra ou soltura do parafuso e as cimentadas não poderiam estar soltas e, os

implantes deveriam apresentar profundidade sondagem até 3mm, e não deveriam ter supuração, mobilidade e/ou evidência de perda óssea radiográfica.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Todos os participantes foram esclarecidos sobre os propósitos do estudo e confirmaram sua aceitação mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para os exames realizados, foi também selecionado o dente homólogo ao implante, para controle. No caso do dente homólogo estar com evidências clínicas de doença periodontal, estar ausente ou estar restaurado, o dente saudável mais próximo ao homólogo foi selecionado.

Procedimentos Clínicos

O exame clínico foi realizado, por um único examinador, tanto nos implantes quanto em um dente do paciente, com a utilização da sonda periodontal Plástica Colorvue PCVNCKIT6 (Hu-Friedy Mfg. Inc – Chicago, IL- EUA). Uma ficha clínica específica (Anexo 2) foi utilizada para anotação dos seguintes parâmetros: índice de placa dicotomizado (Ainamo & Bay, 1975); índice de sangramento marginal modificado (Mombelli & Lang, 1994); sangramento à sondagem. As análises foram realizadas em seis pontos (sítios) por implante/dente. O sítio com maior profundidade de sondagem foi selecionado para coleta do fluido crevicular.

Análise do fluido crevicular

A coleta do fluido crevicular foi realizada uma semana após os exames clínicos para evitar interferência devido à sondagem.

O sítio a ser coletado foi isolado com roletes de algodão ou gaze estéril e a placa supragengival removida. A região foi seca com jato de ar e após 30 segundos o fluido crevicular gengival e periimplantar foram coletados. O fluido foi coletado utilizando-se fitas de papel absorvente –Periopaper (Oraflow Inc.) - que foram introduzidos na bolsa gengival/periimplantar, em direção apical, até sentir resistência, permanecendo então no local por 30 segundos. Os papéis visualmente contaminados com saliva e/ou sangue foram descartados. O volume de fluido coletado foi mensurado imediatamente após a coleta com o auxílio do Periotron 6000 (Oraflow Inc.).

As amostras foram armazenadas em tubos apropriados contendo uma solução de tampão fosfato salina (PBS– NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM, pH 7,4) adicionado de albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL), antipaína (1μg/mL), aprotinina (1μg/mL), leupeptina (1μg/mL), N-ethylmaleimida (1mM) e N-Dodecyl-N, N-Dimethyl-3-Ammonio-1-propanesulfonato (50μg/mL) (Johnson et al., 1997) e então congeladas à uma temperatura de -20°C para posterior análise. As amostras do fluido coletado foram descongeladas e agitadas em vortex. A

quantificação da IL-1 β foi realizada utilizando-se um kit enzimático para imunoenensaio (ELISA) específico para interleucina humana (Hu IL-1 β - BioSource International) e o teste realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Análise do polimorfismo genético

Células da mucosa bucal de todos os pacientes foram coletadas de acordo com o protocolo descrito por Trevilatto e Line, 2000. O DNA foi purificado utilizando o protocolo fenol/clorofórmio. O DNA extraído das células de bochecho foi utilizado como molde, em uma reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (GeneAmp®PCR System 9700) utilizando o protocolo e os seguintes oligonucleotídeos específicos, descritos por Kornman et al., 1997:

5' - CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA - 3'

5' - GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG – 3'

A enzima de restrição Taq I, 2 unidades, (New England BioLabs) foi utilizada para a digestão dos produtos de PCR, durante uma noite, a 67°C. O produto total do PCR/RFLP (18 μ L) foi adicionado de 2 μ L de tampão de amostra e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Para a visualização dos fragmentos de restrição o gel foi corado com nitrato de prata. Esta análise de restrição apresenta o seguinte padrão de bandas:

alelo C= 12pb+85pb+97pb

alelo T= 12pb+182pb

RESULTADO

Foi selecionado um total de 20 pacientes, dos quais 12 (60%) são do gênero feminino e 8 (40%) são o gênero masculino. A idade média dos pacientes é de 46,1 anos, sendo que a idade média para os pacientes do gênero feminino é de 46,58 anos, e para os pacientes do gênero masculino a idade média é de 51 anos.

Foi avaliado um total de 25 implantes, dos quais 8 estavam em região anterior de maxila, 9 na região posterior de maxila, 1 na região anterior de mandíbula e 7 na região posterior de mandíbula. Todos os implantes avaliados foram classificados como saudáveis uma vez que não apresentavam características de dor, mobilidade, supuração ou evidência de perda óssea radiográfica.

As amostras do fluido crevicular analisadas neste estudo não continham IL-1 β ou possuíam quantidade inferior ao limite de detecção do Kit utilizado, ou seja, inferior a 1 ng/ μ L.

Nos indivíduos investigados foi observada maior frequência do alelo C (85%) e menor frequência do alelo T (15%). Na observação do genótipo, houve predominância do genótipo homozigoto para o alelo C, o qual ocorreu em 15 pacientes (75%) da população avaliada, ao contrário do genótipo homozigoto para o alelo T que foi observado em apenas um indivíduo da população analisada (5%) e do heterozigoto C/T presente em 4 (20%) pacientes.

Tabela 1- Distribuição dos alelos

	Total (n=40)
Alelo C	34 (85 %)
Alelo T	6 (15 %)

Tabela 2- Distribuição dos genótipos

	Pacientes (n=20)
Genótipo C/C	15 (75%)
Genótipo T/T	1 (5%)
Genótipo C/T	04 (20 %)

Analisando os dados dos 15 pacientes homozigotos para o alelo C temos um total de 19 implantes, 114 sítios avaliados. Destes sítios, verificamos que 92 (80,7%) estavam ausentes de placa, 99 (86,85%) não apresentavam sangramento marginal e 102 (89,47%) não sangravam a sondagem Tabela 3).

Tabela 7- Condições clínicas dos implantes dos pacientes homozigotos para o alelo C

Sítios Periimplantares(n=114)	Presença de Placa	Sangramento marginal	Sangramento à Sondagem
Presente	22 (19,3%)	15 (13,15%)	12 (10,53%)
Ausente	92 (80,7%)	99 (86,85%)	102 (89,47%)

Analisando os dados dos 5 pacientes que apresentavam em seu genótipo o alelo T, inclui-se a avaliação de 6 implantes, ou seja, 36 sítios, Observamos que em 29 sítios (80,5%) havia ausência de placa, 36 (100%) não apresentavam sangramento marginal e 35 (97,22%) não sangravam à sondagem (Tabelas 4).

Tabela 4- Condições clínicas dos implantes dos pacientes sua apresentavam o alelo C

Sítios Periimplantares(n=36)	Presença de Placa	Índice Gengival	Sangramento à Sondagem
Presente	7 (19,5)	0 (0%)	1 (2,78%)
Ausente	29 (80,5%)	36 (100%)	35 (97,22%)

DISCUSSÃO

Neste estudo não foi possível detectar IL-1 β no fluido crevicular dos sítios avaliados. A IL-1 β é um mediador inflamatório sistêmico, que pode ser detectado no fluido de pacientes sistemicamente comprometidos por doenças de caráter inflamatório. Uma vez que a seleção da amostra foi bastante criteriosa em relação à inclusão dos pacientes no estudo, acredita-se que não há fatores sistêmicos que possam contribuir para a produção de IL-1 β . As condições satisfatórias dos implantes avaliados também não levam a produção de IL-1 β nestes pacientes e assim esta citocina não foi detectada nos fluidos avaliados. Por outro lado, Panagakos et al. (1996) buscaram correlacionar a concentração de IL-1 β não apenas aos implantes saudáveis, mas naqueles que se apresentassem acometidos pela periimplantite. Os autores demonstraram que mesmo nos implantes clinicamente saudáveis, embora em pequenas concentrações (59.47 $\pm$ 15.55 pg/sítio), a IL-1 β é detectada no fluido crevicular. Da mesma maneira, Kao et al. (1995) detectaram maiores concentrações de IL-1 β no fluido crevicular de implantes acometidos pela periimplantite (385.95

pg/ μ L) quando comparados a implantes sadios (120.4, pg/ μ L) de maneira que a concentração de IL-1 β nos sítios doentes é aproximadamente três vezes maior, mostrando uma maior especificidade à atividade de doença e podendo ser um indicativo para o monitoramento da doença. A produção da IL-1 β é regulada por fatores genéticos. A presença de SNPs no gene IL-1B pode alterar a expressão do genética da citocina levando a níveis aumentados de IL-1 β no fluido crevicular. A presença do alelo T no locus +3954 do gene IL-1B é menos freqüente e pode estar relacionada a maior severidade de doença (NARES, 2003).

Em concordância com essa afirmativa, neste estudo o alelo T foi o menos freqüente. De todos os alelos estudados, 34 (85 %) eram o alelo C enquanto que apenas 6 (15 %) foram o alelo T. O genótipo observado com maior freqüência foi o genótipo homozigoto para o alelo C (75 % dos pacientes). Outros estudos encontrados na literatura (FELOUTZIS et al., 2003; GRUICA et al., 2004), buscaram a influência do alelo T com a perda óssea, de maneira que este alelo foi correlacionado a destruição óssea e a condição de doença em implantes osseointegrados.

A ocorrência do alelo T é rara e está relacionada à severidade de doença, neste estudo encontramos apenas um paciente homozigoto para o alelo T. Como todos os pacientes selecionados apresentavam implantes em condições clínicas satisfatórias não foi possível avaliar uma relação entre o genótipo e maior severidade de doença. Portanto, torna-se interessante trabalharmos com um de pacientes com implantes clinicamente sadios e um grupo de pacientes com implantes acometidos pela periimplantite, de maneira que possamos avaliar a condição de doença em relação ao genótipo estudado.

REFERÊNCIAS

1. ADELL, J.C. et al. A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v.6, n.6, p.387-399, Dec. 1981.
2. AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v.25, n.4, p.229-235, Dec. 1975.
3. DINARELLO, C.A. The interleukin 1 family: 10 years of discovery. **FASEB J.**, Bethesda, v.8, n.15, p. 1314-1325, Dec. 1994.

4. ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures osseointegrated oral implants. Part I. Success criteris and epidemiology. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.106, n.1, p.527-551, Feb. 1998a.
5. ESPOSITO, M. et al. Biologycal factors to failures osseointegrated oral implants. Part II. Etiopathogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.106, n.3 p.721-764, June 1998b.
6. FELOUTZIS, A. et al. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in well-maintained population. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.14, n.1, p.10-17, Feb. 2003.
7. FENTON, M. J. et al. Human Pro-IL-1 β gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. **J. Immunol.**, Baltimore, v.140, n.7, p.2267-2273, Apr. 1988.
8. GEIVELIS, M. et al. Measurements of interleukin 6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n.10, p.980-983, Oct. 1993.
9. GEMMELL, E. et al. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontol 2000**, Chicago, v.14 (1), p.112-143, June 1997.
10. di GIOVINE, F. S. et al. Silgle base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 β gene. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.1, n.6, p.450, Sept. 1992.
11. GONZÀLES, J.R. et al. Concentration of interleukin - 1 β and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivits. **J. Clin. Periodontol**, Copenhagen, v.28, n.6, p.544-549, June 2001.
12. GUASH, J. F. et al. Five novel intragenic in the human interleukin 1 genes combine to hight informativety. **Cytokine**, Philadelphia, v.8, n.8, p.5 GRUICA, B. et al. Impacto f Il-1 gene genotype and smoking on prognosis of osseointegrated implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.15, n.4, p. 393-400, Aug. 2004.
13. HANISCH, O. et al. Experimental peri-ilmplant tissue breakdown around hydroxyapatite-coated implants. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.1, p.59-66, Jan. 1997.
14. JOHNSON, T. C. et al. Experimental gingivits in periodontits-susceptible subjects. **J. Clin. Periodontol**, Copenhagen, v.24, n.9 p.618-625, Sept. 1997.

15. KAO, R. T. et al. Increased interleukin-1 β in the crevicular fluid of diseased implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.10, n.6, p.696-701, Nov/Dec. 1995.
16. KORNMAN, K.S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.1, p.72-77, Jan. 1997.
17. KORNMAN, K.S.; di GIOVINE, F.S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.3, n.1, p.327-338, July 1998.
18. LEONHARDT, A. et al. Microbial findings at failing implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.10, n.5, p.339-345, Oct. 1999.
19. LINDHE, J. et al. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.3, n.1, p.9-16, Mar. 1992.
20. LINDQUIST, L. W. et al. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, n.4, p.329-336, Dec. 1996.
21. LISTGARTEN, M. A.; Lai C. H. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. **J. Periodontol.**, Chicago, v.70, n.4, p.431-437, Apr. 1999.
22. MOGI, M. et al. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.44, n.6, p.535-539, June 1999.
23. MOMBELLI, A. & LANG, N.P. Microbial aspects of implant dentistry. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.4, p.74-80, Dec. 1994.
24. MURATA, M. et al. Osteoclastin, deoxypyridinoline and interleukin 1 β in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.13, n.6, p.637-643, Dec. 2002.
25. NARES, S. The genetic relationship to periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.32, n.1, p.36-49, June 2003.

26. NEMETZ, A. et al. Allelic variation at the interleukin 1 β gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel disease. **Gut.**, London, v.49, n.5, p.644-649, Nov. 2001.
27. SCHOU, S. et al. Microbiology of ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.7, n.3, p.190-200, Sept. 1996.
28. PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.14, n.1, p.216-48, June 1997.
29. PANAGAKOS, F.S. et al. Detection and measurement of inflammatory cytokines in implant crevicular fluid: a pilot study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.11, n.6, p.794-799, Nov/Dec. 1996.
30. ROGERS, M. A. et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or success of dental implants? **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.37, n.1, p.37-41, Feb. 2002.
31. SHIMPUKU, H. et al, 2003. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.14, n.4, p.423-429, Aug. 2003.
32. TAYLOR, J. J. et al. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.35, p.158-182, 2004.
33. TREVILATTO, P. C.; LINE, S.R. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. **J. Forensic. Odontostomatol.**, v.18, n.1, p.6-9, June 2000.