

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
FRANCISCO RAFAEL DA COSTA JÚNIOR

***ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA MMP-3 E MMP-8 E
PERDA PRECOCE DE IMPLANTES DENTÁRIOS OSSEOINTEGRADOS***

CURITIBA

2011

FRANCISCO RAFAEL DA COSTA JÚNIOR

***ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA MMP-3 E MMP-8 E
PERDA PRECOCE DE IMPLANTES DENTÁRIOS OSSEOINTEGRADOS***

BANPESQ/ Thales: 2009024021

Dissertação apresentada como requisito a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

CURITIBA

2011

Dedicatória

À minha mãe, Janete Terciotti da Costa, esteja onde ela estiver, todas as minhas conquistas tenho certeza que são frutos do seu cuidado. Todas as conquistas na minha vida, tenho ela ao meu lado, me guiando sempre para o lado bom me dando suporte, saúde e felicidade.

À minha irmã, Silvia Costa Cabral, pelo carinho, companheirismo e por no silêncio de um olhar provar para mim que não estou sozinho e me fazer acreditar que eu posso tudo o que eu sonhar.

Aos meus avós, Hilda e Alcides Terciotti, por me ensinarem tudo o que sou hoje em dia. Não precisei deles para ter a vida, mas eles me ensinaram a viver de um modo muito especial onde serei grato por tudo, por todo meu caminho, por esse amor incondicional.

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos**, a minha orientadora, pela dedicação, interesse com o trabalho e principalmente por tentar fazer tudo isso acima de tudo, fazer parte do meu conhecimento, da minha formação. Agradeço pela oportunidade de me orientar e desenvolver esse trabalho, com todo seu conhecimento e paciência. Com certeza uma profissional a qual me espelho e admiro muito.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, uma das peças chave para o desenvolvimento desse trabalho, sendo que boa parte dos experimentos foram feitos nas dependências de seus laboratórios, tanto a parte de amplificação das amostras como nos resultados dos géis, fotografados em seus aparelhos.

Ao Prof. Dr. Rubens Berttazolli Filho, por ceder todos os aparelhos e aparatos necessários para o desenvolvimento da pesquisa, sempre disposto a ajudar e passar seu conhecimento, fazendo parte desse trabalho indiretamente.

À **Profa. Dra. Paula Cristina Treviatto**, do programa de Pós-graduação de Odontologia da PUC-PR, por ceder algumas amostras para análise, tornando meu trabalho mais estatisticamente confiável.

Aos **voluntários** que gentilmente aceitaram participar desse estudo.

À todos os orientandos do Prof. Silvio Sanches Veiga, **Valéria, Dilza, Fernando, Larissa, Thiago, Gabriel e demais orientandos**, por me acompanhar ao laboratório toda vez que eu precisava usar o laboratório, algumas vezes deixando de fazer seu próprio trabalho pra me ajudar a finalizar o meu.

Aos grandes amigos que conquistei no departamento, **Loli e Daniel**, por me ajudar, por me socorrer quando eu não tinha mais tempo e tinha que trabalhar. Ao carinho e companheirismo entendendo a minha situação.

Às minhas sobrinhas, **Nathália, Priscilla e Maria Fernanda** por me dar força e me fazerem sentir esse amor que sinto em estar vivo.

Ao **Gabriel Ayroso** pelo companheirismo e carinho, sempre respeitando meu espaço e me fazendo ver adiante.

Aos meus amigos que a vida me permitiu escolher, **Gleidson, Indio, Ana Paula Fleck e Catiane**, pelo simples fato de existirem e estarem presentes em mais uma fase da minha vida, concluída.

***"É necessário ter o caos aqui dentro para gerar uma
estrela."***

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Apesar do alto índice de sucesso nos tratamentos com implantes dentários osseointegrados, estudos mostram que perdas podem ocorrer. O fenômeno em cacho, onde o mesmo paciente apresenta múltiplas perdas, suporta a evidência de que a característica individual tem um papel importante na falha da osseointegração, entretanto pouco se sabe sobre a influência genética nesse processo. Polimorfismos em genes de metaloproteases (MMPs) podem alterar a expressão dessas e estão relacionados a diversas patologias, inclusive ao processo de osseointegração. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de polimorfismos no gene da MMP-3 (-1612) e MMP-8 (-799) correlacionando-os com a perda de implantes dentais. O DNA dos voluntários (grupo *teste*, 101 pacientes com perda precoce de implantes e grupo *controle*, 101 pacientes com sucesso de implantes) foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, analisado por PCR e RFLP. A análise estatística foi realizada pelo Teste Qui-Quadrado (significância de 5%). O programa ARLEQUIN verificou equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Os resultados indicam que o polimorfismo estudado no gene da MMP-3 (-1612) parecem não ser um bom marcador genético de susceptibilidade a falha de implantes. Entretanto, o polimorfismo na posição -799 do gene da MMP-8 pode estar associado com a falha de implantes osseointegrados, mostrando um papel ativo da MMP-8 na patogênese da osseointegração, onde indivíduos com o alelo T aparentam ter um risco maior de perder implantes.

Palavra-chave: Osseointegração, Implante dentário, Polimorfismo, MMP-3, MMP-8.

ABSTRACT

Despite the high success rate in treatment with osseointegrated dental implants, studies show that losses may occur. The phenomenon of trusses, where the same patient shows multiple losses, supports the evidence that the individual characteristic plays an important role in the failure of osseointegration, but little is known about the genetic influence in this process. Polymorphisms in genes of metalloproteinases (MMPs) may alter their expression and are related to several diseases, including the process of osseointegration. The objective of this study was to investigate the influence of polymorphisms in the gene for MMP-3 (-1612) and MMP-8 (-799) correlating them with the loss of dental implants. The DNA of the volunteers (test group, 101 patients with early loss of implants and control group, 101 patients with successful implants) was obtained from buccal mucosa cells, analyzed by PCR and RFLP. Statistical analysis was performed by Chi-Square (5% significance). The program ARLEQUIN shows the balance of Hardy-Weinberg. The results indicate that the polymorphism in the gene for MMP-3 (-1612) do not seem to be a good genetic marker of susceptibility to implant failure. However, the polymorphism at position -799 of the gene for MMP-8 is associated with the failure of dental implants, showing an active role of MMP-8 in the pathogenesis of osseointegration, where individuals with the T allele appear to have a greater risk of losing implants .

Keyword: Osseointegration, Dental Implant, Polymorphism, MMP-3, MMP-8

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURA 01. Ilustração das etapas cirúrgicas para colocação do implante dental	18
FIGURA 02. Genótipos da MMP-3	35
FIGURA 03. Genótipos de MMP-8	37
TABELA 01. Informações sobre condições da PCR e RFLP	32
TABELA 02. Média de idade, frequência de gênero dos indivíduos e número total de implantes colocados e perdidos nos dois grupos estudos.	34
TABELA 03. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-3	36
TABELA 04. Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-8	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: por cento

ϕ X174-RF *Hae* III DNA *digest*: padrão de massa molecular

μl: microlitros

A: adenina

abutment: conector transmucoso do implante

C: citocina

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

et al.: e outros (abreviatura de *et alii*)

F: *Forward* (*primer 5`*)

g: grama

G: guanina

IL: interleucina

mg: miligrama

ml: mililitros

mM: miliMolar

MMP: Metaloprotease da Matriz Extracelular

ng: nanogramas

°C: graus Celsius

OD: densidade óptica

OD: odds ratio

ON: durante a noite (*overnight*)

pb: par(es) de base(s)

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

pH: potencial hidrogeniônico

R: *Reverse* (*primer 3`*)

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento(s) de restrição (*Restriction*

Fragment Length Polymorphism)

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotação por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polimorphism*)

T: timidina

TA: Temperatura de Anelamento

TBE: tampão tris-borato, para corrida de eletroforese

TE: Tris/EDTA

TGF: fator de crescimento Tumoral (*Tumor Growth Factor*)

TIMP: proteínas inibidoras específicas de tecido (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*)

TNF: fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

U: unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
<u>1.1. Objetivo Geral</u>	15
<u>1.2. Objetivos Específicos</u>	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Implantes osseointegrados	16
2.2. Metaloproteases da matriz	21
2.2.1. <i>MMP-3</i>	23
2.2.2. <i>MMP-8</i>	24
2.3. Polimorfismo genético relacionados as MMPs	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Casuística	29
3.1.1. <i>Critérios para exclusão de pacientes</i>	29
3.1.2. <i>Critérios determinantes de falha de implantes</i>	30
3.2. Análise do polimorfismos genéticos	30
3.2.1. <i>Obtenção do DNA</i>	30
3.2.2. <i>Extração do DNA</i>	31
3.2.3. <i>Reação de PCR</i>	32
3.2.4. <i>Determinação do Genótipo</i>	32
3.2.5. <i>Eletroforese</i>	33
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Amostras	35
5.2. <i>MMP-3</i>	36
5.3. <i>MMP-8</i>	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS	46
9. ANEXO 1: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	67

1. INTRODUÇÃO

As evidências clínicas da osseointegração revolucionaram a implantodontia, tornando os implantes osseointegrados a alternativa mais estética e funcional para diversas situações de edentulismo (HENRY, 2005).

O conceito de osseointegração foi desenvolvido por BRANEMARK em meados de 1960 (ESPOSITO *et al.*, 1998) e desde então definições variadas de osseointegração têm sido propostas, incluindo a descrição da sobrevida clínica, avaliação da capacidade mecânica e aparência morfológica da interface implante-tecido (BRANEMARK *et al.*, 1995).

Do ponto de vista biológico, BRANEMARK (1996) definiu a osseointegração como a presença de tecido ósseo neoformado em íntima aposição com a superfície do implante, sendo que ao nível de microscopia óptica não se deve observar interposição de tecido fibroso. Entretanto, sabe-se que existem pontos de contato osso-implante e pontos onde se verifica a interposição de tecido fibroso (LINDHE, 2005). De qualquer maneira deve ser estabelecida uma conexão estrutural e funcional direta, capaz de suportar cargas fisiológicas normais sem que ocorra deformação excessiva ou rejeição. Portanto, a interação entre o tecido ósseo e a superfície do implante é o principal fator responsável pelo sucesso do tratamento com implantes osseointegrados.

Apesar da osseointegração apresentar resultados previsíveis, reproduzíveis e estáveis ao longo do tempo (PINTO *et al.*, 2000) garantindo um alto índice de sucesso no tratamento com implantes dentários, entre 85 a 94% após 10 anos (HOLM-PEDERSEN *et al.*, 2007), falhas ainda ocorrem. Além disso, o aumento do número

desse procedimento ao longo dos últimos anos torna cada vez mais frequente às falhas de implantes e complicações relacionadas (LEVIN, 2008).

A literatura demonstra que diversos fatores podem estar associados com a falha de implantes osseointegrados. Entretanto, um pequeno número de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (DEAS *et al.*, 2002), sugerindo uma incapacidade de cicatrização do hospedeiro. Dessa maneira parece existir um grupo de risco, indicando que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrados.

O desafio atual no tratamento com implantes dentários está na habilidade em detectar pacientes de risco. Dessa maneira, o conhecimento da etiologia e de fatores associados à falha de implante pode ajudar no reconhecimento desses pacientes e auxiliar o desenvolvimento de um tratamento adequado em conjunto com estratégias de prevenção.

1.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência de polimorfismos na região promotora do gene da MMP-3 (-1612) e da MMP-8 (-799) correlacionando-os com a perda de implantes dentários osseointegrados, e assim analisar possíveis marcadores genéticos relacionados à osseointegração.

1.2. Objetivos Específicos

- Selecionar um grupo amostral de pacientes não fumantes em bom estado de saúde geral, que realizaram tratamento com implantes dentários osseointegrados, utilizando o Sistema Branemark, sem apresentarem intercorrência pós-operatória ou terem se submetido a técnicas regenerativas prévias ou concomitantes à instalação dos implantes. Obtendo sucesso ou falha na osseointegração precoce.

- Investigar a associação do polimorfismo -1612 da MMP-3 com a perda precoce de implantes osseointegrados na população brasileira.

- Investigar a influência do polimorfismo -799 da MMP-8 com a perda precoce de implantes osseointegrados na população brasileira.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Implantes osseointegrados

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

Quando há uma regeneração adequada, se estabelece um contato direto entre a superfície de metal e o tecido ósseo. Quando no lugar da regeneração acontece um processo de reparo verifica-se a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo no local, onde citocinas, como interleucinas (ILs) e fator de crescimento transformante (TGFs), orientam a migração e proliferação de fibroblastos culminando com a substituição do tecido de granulação, inicialmente formado, por uma cicatriz avascular composta por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tecido elástico e outros componentes da matriz extracelular (COTRAN *et al.*, 1999). Essas citocinas ainda sinalizam para diversos tipos celulares estimulando a produção de prostaglandina e metaloproteases da matriz (MMPs), as quais estão associadas à degradação de tecido ósseo e conectivo (GREENSTEIN & HART, 2002). Assim, na falha de implantes ocorre um processo de reparo, sendo que a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo promove à mobilidade do implante e conseqüentemente a necessidade de removê-lo.

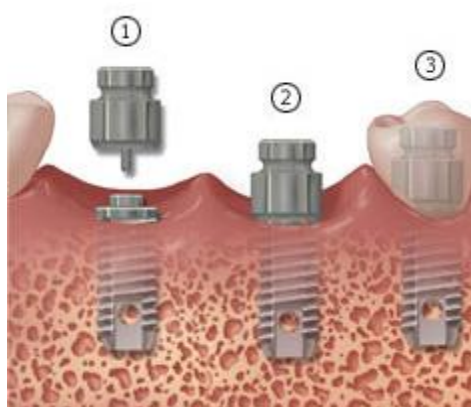
Além da osseointegração, os implantes dentais devem integrar-se ao tecido epitelial e conjuntivo, para que possam de forma previsível ser realmente duradouros (SCHROEDER *et al.*, 1976). Dessa maneira, para o implante dental ser definido como sucesso é necessário que ocorra uma associação funcional entre implante, tecido ósseo e mucoso; além de apresentar um resultado estético satisfatório (ALBREKTSSON *et al.*, 1986). Esse sucesso depende de diversos fatores como: biomaterial usado (PORTER & VON FRAUNHOFER, 2005), topografia e aspereza da superfície do implante (ALBREKTSSON, 1983), e quantidade e qualidade apropriada do osso (ESPOSITO *et al.*, 1999), entre outros.

Dentre muitos materiais possíveis, o titânio é atualmente considerado o material de escolha para a confecção de implantes dentários osseointegrados devido a sua ótima aceitação biológica. Sabe-se que o titânio, assim como qualquer metal reativo, quando em contato com a atmosfera forma espontaneamente uma camada de óxido que o torna muito resistente a ataques químicos, inclusive aos líquidos corporais. O alto grau de biocompatibilidade é atribuído, em parte, a esta estável camada de óxido, a qual facilita a deposição e adesão da matriz extracelular na interface osso-implante (KASEMO *et al.*, 1988).

Atualmente diversos sistemas de implantes osseointegrados são comercializados. Um dos mais bem estudados (ESPOSITO *et al.*, 1998) é o Sistema Branemark, segundo o qual se preconiza a utilização de parafusos de titânio puro e a instalação do implante em duas etapas cirúrgica. Numa primeira etapa o parafuso de titânio é inserido no alvéolo previamente preparado e aguarda-se a osseointegração primária. Nesse período, que varia entre 3 a 4 meses para maxila e 5 a 6 meses para mandíbula, recomenda-se uma relativa imobilidade na superfície implante-osso, visando favorecer o crescimento ósseo nos sulcos/ranhuras do parafuso (SPIEKERMANN *et al.*,

1995). Numa segunda etapa coloca-se a conexão transmucosa (*abutment*), a qual receberá a prótese logo após a cicatrização da mucosa, que ocorre em 15 dias, em média (Figura 1).

Figura 1: Ilustração das etapas cirúrgicas para colocação do implante dental.



Legenda

1. Primeira etapa cirúrgica: Colocação do parafuso de titânio no alvéolo.
2. Segunda etapa cirúrgica: Colocação do transmucoso (*abutment*).
3. Colocação da prótese dentária.

Fonte: <http://tonyhilldental.com.au/pages/dental-implants.php>

Atualmente, sabe-se que em situações particulares a colocação de implantes em uma única fase cirúrgica pode trazer resultados melhores devido a pequenos micromovimentos que estimulariam o processo de osseointegração, demonstrando ter sucesso previsível quando protocolos apropriados são seguidos (CHEN *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2006; WAASDORP *et al.*, 2010). As reduções do tempo de tratamento e do número de procedimentos são grandes vantagens desta técnica (HAMMERLE *et al.*, 2004); entretanto, estudos mais completos são necessários e a maioria das situações parece requerer duas etapas cirúrgicas para garantir uma maior taxa de sucesso. Portanto, o Sistema Branemark ainda é o mais utilizado nos tratamentos com implantes dentais.

A epidemiologia da falha de implantes que utilizam o Sistema Branemark em duas etapas cirúrgicas já é bem determinada, sendo as perdas biológicas relativamente raras: 7.7% em 5 anos (ESPOSITO *et al.*, 1998; ESPOSITO *et al.*, 1999). A falha

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

O sucesso clínico do implante não envolve somente sua permanência no sítio implantado, deve ainda incluir imobilidade quando não-conectado à prótese; ausência de radiolucidez periimplantar, ausência de sinais e sintomas persistentes e/ou irreversíveis como dor, infecção, neuropatias, parestesia ou violação do canal mandibular; perda óssea vertical inferior a 0,2 mm anualmente após o primeiro ano em função; além de estar funcionalmente conectado à prótese (SMITH & ZARB, 1989). Se algum desses critérios não é atingido o implante é considerado como “sobrevivente”, quando consegue exercer alguma função ou perdido, quando é necessário removê-lo.

A literatura (ASKARY *et al.*, 1999a; ASKARY *et al.*, 1999b; PINTO *et al.*, 2000) demonstra que diversos fatores podem estar associados com a falha de implantes osseointegrados, sendo classificados em **exógenos** (relacionados ao operador ou ao biomaterial) e **endógenos** (relacionados ao hospedeiro e subdivididos em locais ou sistêmicos). Forças oclusais excessivas e infecção (periimplantite) são os principais fatores associados à perda tardia, enquanto que trauma cirúrgico excessivo, carga prematura e contaminação bacteriana estão mais relacionados à perda precoce (ESPOSITO *et al.*, 1998; EKFELODT, 2001). Alguns autores, ainda sugerem que o

volume e a qualidade óssea são fatores fortemente associados a esse tipo de fracasso (FRIBERG *et al.*, 1991; HUTTON, 1995).

Outros fatores podem influenciar na falha do implante, como o tabagismo (STRIETZEL *et al.*, 2007), a idade (PIATTELLI *et al.*, 2003), *design* do implante (LEE *et al.*, 2005), prevenções de higiene básica como escovar os dentes e uso de enxaguatórios bucais (JEMT & HAGER, 2006), terapia de manutenção (SILVERSTEIN & KURTZMAN, 2006), condição médica apropriada (ASKARY *et al.*, 1999), uso de medicação e perfil socioeconômico (MONTES *et al.*, 2007), entre outros.

Apesar de diversos fatores poderem estar associados com a falha na osseointegração; a literatura demonstra que um número significativo de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (DEAS *et al.*, 2002), sugerindo uma incapacidade de cicatrização do hospedeiro. A ocorrência de insucesso no tratamento com implantes parece não estar aleatoriamente distribuída na população; indivíduos que perderam um implante são mais propensos a sofrerem outras perdas, é o chamado fenômeno em cacho ou clusterização (WEYANT & BURN, 1993; HUTTON *et al.*, 1995; TONETTI, 2000). Assim parece existir um grupo de risco, indicando que fatores intrínsecos ao hospedeiro desempenham um papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrados. De fato, esse fenômeno de concentração das perdas em certos indivíduos sugere que a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, em conjunto com o processo de osseointegração, são influenciados por fatores genéticos (MONTES *et al.*, 2007).

A reação inflamatória que ocorre durante a perda de implantes, envolve danos das células e estruturas de tecidos conectivos, sendo que o principal componente envolvido é o colágeno tipo I, encontrado no ligamento periodontal e matriz orgânica do

osso alveolar. Portanto, as metaloproteinases da matriz (MMPs) apresentam um papel significativo nessa destruição (BIRKEDAL & HANSEN, 1993).

2.2. Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma grande família de enzimas endopeptidases que coletivamente tem a capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes (BIKERDAL-HANSEN *et al.*, 1993).

As MMPs são secretadas na forma de zimógeno e como um complexo enzima-inibidor (STRICKLIN *et al.*, 1983; EMONARD & GRIMAUD, 1990), sendo que sua ativação se dá em duas etapas. Inicialmente o zimógeno sofre clivagem proteolítica que resulta na remoção da porção amino-terminal. A clivagem pode ser feita por várias enzimas como a tripsina, plasmina, catepsina B e elastase. Numa segunda etapa, a enzima sofre autodigestão que resulta na sua forma ativada (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Acredita-se que a ativação é causada pela ruptura da ponte existente entre o aminoácido cisteína e o íon zinco, que bloqueia o sítio ativo da molécula. Outra característica comum entre as MMPs é a dependência dos íons zinco e cálcio. A interação do zinco com três resíduos de histidina, presentes no domínio catalítico da molécula, tem importância crucial para o funcionamento adequado das MMPs (HADLER-OSLEN *et al.*, 2011). Os dois átomos de cálcio conferem estabilidade à estrutura terciária da proteína (DIOSZEGI *et al.*, 1995).

A família das MMPs em humanos é formada por vinte e quatro membros, entretanto apresenta vinte e três proteínas uma vez que a MMP-23 é codificada por dois genes idênticos (HADLER-OSLEN *et al.*, 2011). As MMPs exibem similaridades

estruturais e funcionais. Para ser classificada como uma MMP, a proteína deve ter pelo menos um pró-domínio e um domínio catalítico, ligado a um sítio de zinco. Adicionalmente as MMPs possuem regiões ricas em prolinas e um domínio C-terminal hemopexin.

Todas as MMPs possuem um arranjo gênico similar, sugerindo que elas foram duplicadas de um gene ancestral comum. Pelo menos oito dos genes das MMPs humanas, estão no cromossomo 11, entre elas MMP-1, 3 e 8. Outros genes de MMPs estão distribuídos entre os cromossomos 1, 8, 12, 14, 16, 20 e 22 (SHAPIRO, 1998).

As MMPs desempenham papel importante em vários processos de remodelação fisiológica, como no desenvolvimento embrionário, na involução pós-parto, remodelação óssea e cicatrização de feridas (WOESSNER, 1991). Alterações nas atividades das MMPs têm sido relatadas em diversos processos patológicos, como na inflamação através da migração leucocitária (KNAUPER *et al.*, 1993), destruição de cartilagem e osso na artrite reumatóide (YE *et al.*, 2007), infarto agudo do miocárdio (KOH *et al.*, 2007), osteoartrite (BARLAS *et al.*, 2008), colite (MADISCH *et al.*, 2011), fibrilação atrial persistente (LOMBARDI *et al.*, 2011), no crescimento e expansão de tumores benignos e metástase (BASSET *et al.*, 1997; JOHNSEN *et al.*, 1998; EGEBLAD & WERB, 2002), diversos cânceres (ZHOU *et al.*, 2010, PARK *et al.*, 2011, WU *et al.*, 2011), surdez (NAM *et al.*, 2011), doença periodontal (SOUZA *et al.*, 2003) e reabsorção óssea (OKADA *et al.*, 1995).

As MMPs são sintetizadas em baixos níveis até sua transcrição em células inflamatórias ser induzida por sinais como lipopolisacarídeos, citocinas, fatores de crescimento e estresse mecânico. A atividade das MMPs é regulada em múltiplos níveis, incluindo conversão da pró-enzima na sua forma ativa, inibição por inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) e regulação da transcrição.

A literatura comprova que as MMPs estão presentes no fluido sulcular periimplantar (APSE *et al.*, 1989; INGMAN *et al.*, 1994, TERONEN *et al.*, 1997; KIVELÄ-RAJAMÄKI *et al.*, 2003; SORSA *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2008; KUULA *et al.*, 2008) e parecem ter um importante papel na patogênese da falha de implantes (TERONEN *et al.*, 1997; LEITE *et al.*, 2008).

2.2.1. MMP-3

A MMP-3, também chamada de estromelisina-1, é capaz de degradar colágeno tipo II, IV, IX, elastina, gelatina, proteoglicanos, fibronectina, entre outras proteínas extracelulares, além de ativar outras MMPs (BIRKEDAL-HANSEN H, *et al.*, 1993). Essa estromelisina tem sido associada à cicatrização de feridas (DI COLANDREA *et al.*, 1998; BULLARD *et al.*, 1999), e em conjunto com outras MMPs é amplamente expressa em lesão aterosclerótica, e está associada à aterosclerose (HENNEY *et al.*, 1991). Essa MMP também está associada a infarto do miocárdio (SIMINELAKIS *et al.*, 2009; GHADERIAN *et al.*, 2010), risco de estenose da artéria coronária (FALLAH *et al.*, 2010), obesidade (SOOKOIAN *et al.*, 2005), doença cerebrovascular (doença de Moyamoya) (LI *et al.*, 2010), úlcera duodenal (YEH *et al.*, 2010), desenvolvimento do aneurisma (NEWMAN *et al.*, 1994; KNOX *et al.*, 1997) e carcinoma epidermoide e fibrose submucosa oral (CHAUDHARRY *et al.*, 2010) entre outras patologias.

Essa enzima é produzida geralmente por vários tipos de células, como fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos, células sinoviais e condrócitos (CONSTANTIN *et al.*, 2002), mas também pode ser observada na margem de processos invasivos (KUSUKAWA *et al.*, 1995) e em células epiteliais durante o processo de reparação tecidual (MADLENER *et al.*, 1998).

A expressão da MMP-3 é primariamente regulada ao nível da transcrição, onde o promotor do gene responde a vários estímulos, incluindo fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor, oncogenes entre outros (BUTTICE *et al.*, 1991). Sua expressão também pode ser induzida em resposta às condições locais, como a carga mecânica (LEONG *et al.*, 2010) e inflamação (ITO *et al.*, 1996). Sua produção por célula do tecido conectivo da gengiva é de extrema importância para a ativação da cascata latente de pró-MMPs, como a pró-MMP-1, 8, 9, e 13 (KAHARI & SAARIALHO-KERE, 1999).

Estudos evidenciam o aumento do nível de RNAm de MMP-3, quando cultura de osteoblastos são estimulados por fatores de reabsorção tal como citocinas (IL-1 β e TNF), hormônio da paratireóide e prostaglandinas E₂ (UCHIDA *et al.*, 2000).

A literatura sugere que alto nível de MMP-3 e TIMP-1 em conjunto com MMP-8 e 9 são de grande risco para a progressão de periodontites (BEKLEN *et al.*, 2006).

2.2.2. MMP-8

A MMP-8, também conhecida como collagenase-2, foi anteriormente descoberta como sendo um produto exclusivo de neutrófilos, mas subsequentemente mostrou ser expressa por uma variedade de outros tipos de células como as endoteliais, musculares lisas, macrófagos, polimorfonucleares, fibroblastos gengivais, queratinócitos, condrócitos e odontoblastos (COLE *et al.*, 1996; PALOSAARI *et al.*, 2000; PRIKK *et al.*, 2001; WAHLGREN *et al.*, 2001; HERMAN *et al.*, 2001; PIRILA *et al.*, 2003) bem como células de câncer bucal (MOILANEN *et al.*, 2002).

Potencialmente a MMP-8 degrada colágeno tipo I, contribuindo para degradação e remodelação tecidual (GALIS *et al.*, 1994) e alguns componentes fora da matriz,

como a angiotensina I (LAXTON *et al.*, 2009). Ela é um importante mediador de destruição em diversas doenças inflamatórias e está relacionada a doenças cardiovasculares (HERMAN *et al.*, 2001), bronquiectasia (LEE *et al.*, 2007), insuficiência pulmonar (RODERFELD *et al.*, 2009), periodontite (CHEN *et al.*, 2000), melanomas (VIHINEN *et al.*, 2008), câncer de cabeça (KÖHRMANN *et al.*, 2009), arteroesclerose (LAXTON *et al.*, 2009), cicatrização em diabéticos (KUMAR *et al.*, 2006) entre outras.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ e colaboradores (2007) demonstraram que ratos nulos para MMP-8 apresentam um atraso significativo na cicatrização de feridas e uma alteração na resposta inflamatória, com um atraso de infiltração neutrofílica durante os primeiros dias e uma inflamação persistente em momentos posteriores. Essas alterações são acompanhadas por alterações na sinalização via TGF- β_1 . Além disso, os autores mostraram que esses ratos tiveram um aumento significativo na expressão de MMP-9, sugerindo que as proteases poderiam agir coordenadamente no processo.

MMP-8 é a principal MMP envolvida na destruição tecidual na periodontite (TERVAHARTIALA *et al.*, 2000; KIILI *et al.*, 2002) e elevados níveis de MMP-8 foram demonstrados no fluido peri-implantar (NOMURA *et al.*, 2000; KIVELA-RAJAMÄKI *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2008).

MMP-8 apresenta diferentes isoformas; KIVELA-RAJAMÄKI e colaboradores (2003) demonstram que durante inflamação no fluido periimplantar a forma latente de MMP-8 de polimorfonucleares está reduzida, enquanto há um elevado nível de MMP-8 tipo fibroblastos, o qual parece estar submetido a mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento. Quando a reabsorção óssea não apresenta inflamação visível, os níveis de MMP-8 apresentam-se semelhantes ao de sítios saudáveis, o que sugere um estágio

latente ou a remissão da doença (KIVELA-RAJAMÄKI *et al.*, 2003). Isso comprova a importância da MMP-8 no complexo processo de osseointegração.

2.3. Polimorfismo Genético

Polimorfismos são pequenas variações genéticas onde um ou mais alelos tem frequência gênica maiores que 1% (THOMPSON *et al.*, 1991). Aproximadamente 90% dos polimorfismos de DNA são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs- *Single Nucleotide Polymorphisms*), devido a uma troca de uma única base (RA & PARK, 2007). Embora a maioria dos polimorfismos de DNA seja funcionalmente neutro, uma parte deles pode exercer efeito alelo específico na regulação da expressão gênica ou função das proteínas codificadas, e assim tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a uma determinada patologia (YE, 2000). Polimorfismos em região promotora podem influenciar a regulação transcricional de proteínas, como as MMPs (CARGILL *et al.*, 1999).

Polimorfismos em genes que expressam metaloproteinases são associados com muitas doenças, dentre elas cirrose hepática (HUNG *et al.*, 2009), fibrilação atrial (GAI *et al.*, 2009), glaucoma (CONG *et al.*, 2009), esclerose múltipla (FERNANDES *et al.*, 2009), infarto do miocárdio (ROMÁN-GARCÍA *et al.*, 2009), mudanças na mineralização dentária (SOUZA *et al.*, 2003).

O promotor do gene da MMP-3, localizado no cromossomo 11 (11q22.3), apresenta um polimorfismo na posição -1612 (YE *et al.*, 1995), o qual mostra uma variação na sequência de adenina no sitio inicial de transcrição. Após uma sequência de 5 adeninas, pode haver adição de mais uma adenina, resultando no alelo 5A e 6A (rs3025058). O alelo 5A parece aumentar a atividade e transcrição da MMP-3, e

enquanto o alelo 6A diminuir (YE *et al.*, 1996). Esse SNP tem sido associado artrite reumatóide (SCHERER *et al.*, 2010), degeneração do disco lombar (YUAN *et al.*, 2010), a infarto do miocárdio (TERASHIMA *et al.*, 1999), doenças cardiovasculares (YE *et al.*, 2006; OZKOK *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009), aneurisma (YOON *et al.*, 1999), câncer (BRAMHALL *et al.*, 1997, ZINZINDOHOUE *et al.*, 2005; VAIRAKTARIS *et al.*, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2010), progressão da doença arterial coronariana (BEYZADE *et al.*, 2003; HIRASHIKI *et al.*, 2003), hipertensão (DJURIC *et al.*, 2005), doença periodontal (ASTOLFI *et al.*, 2006), doença pulmonar (SANTUS *et al.*, 2009), miopia (HALL *et al.*, 2009), enxaqueca (KARA *et al.*, 2007), aterosclerose carotídea (DJURIC *et al.*, 2008) úlcera duodenal (YEH *et al.*, 2010), carcinoma epidermoide e fibrose submucosa oral (CHAUDHARRY *et al.*, 2010) entre outras patologias.

O gene da MMP-8, localizado no cromossomo 11, apresenta um polimorfismo funcional na região promotora -799, caracterizado por uma substituição de uma citosina por uma timidina - C-799T (rs11225395) (WANG *et al.*, 2004). Tal polimorfismos já foi associado à dilatação crônica dos brônquios (LEE *et al.*, 2007) e câncer de mama (DECOCK *et al.*, 2007).

Em estudos prévios foi demonstramos que o polimorfismo G-1607GG da MMP-1 está relacionado à falha na osseointegração, pacientes com alelo 2G possuem um risco três vezes maior de perda de implantes (SANTOS *et al.*, 2004). Além disso, verificou-se que o haplótipo dos SNPs G-1607GG e A-519G nesse gene está associado com o processo de osseointegração (LEITE *et al.*, 2008). Também foi comprovada a associação entre o polimorfismo no intron 2 da IL-1RN (antagonista do receptor da interleucina 1) (+3954) e pacientes com múltiplas perdas de implantes (MONTES *et al.*, 2009). Dessa maneira fica comprovada a influência de polimorfismos genéticos no processo de osseointegração.

As metaloproteinases da matriz desempenham um papel fundamental na destruição tecidual e reabsorção óssea, além disso, a literatura demonstra que essas proteinases estão presentes no fluido sulcular periimplantar e parecem ter um importante papel na patogênese da falha de implantes. Uma vez que as MMP-3 e MMP-8 são capazes de degradar uma grande quantidade de proteínas extracelulares e influenciar degradação e remodelação de tecidos injuriados, o estudo desses genes pode ser importante para uma melhor compreensão do processo de osseointegração.

A descoberta de marcadores genéticos relacionados a osseointegração poderia facilitar a identificação de indivíduos susceptíveis a perda de implantes. Nesse contexto o estudo da associação de polimorfismos genéticos com a perda de implantes contribui significativamente para uma melhor compreensão do processo de osseointegração e torna possível uma seleção mais criteriosa dos pacientes, bem como o desenvolvimento de estratégias de prevenção e terapêutica individualizada visando aumentar a taxa de sucesso dos implantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

A obtenção do material foi realizada mediante consentimento do grupo amostral, após breve explanação dos objetivos do estudo, segundo as recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa. Todos os pacientes apresentavam bom estado de saúde geral, sendo divididos em dois grupos.

- *Grupo Teste*: 101 pacientes que sofreram perda precoce de implantes dentários osseointegrados.
- *Grupo Controle*: 101 pacientes que obtiveram sucesso no tratamento com implantes dentários osseointegrados, estando os implantes em carga funcional a pelo menos 6 meses, sem mobilidade ou sintomatologia.

Pacientes de ambos os grupos foram selecionados na Clínica de Especialização em Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, no Instituto Latino-Americano de Pesquisa Odontológica (ILAPEO) - Curitiba e em clínicas particulares nas cidades de Piracicaba (São Paulo), Salvador (Bahia) e Curitiba (Paraná). Todos os centros com taxas de insucesso para o tratamento com implantes menores que 5%, condizendo com o aceito pela literatura (ESPOSITO *et al.*, 1998).

3.1.1. Critérios para Exclusão de Pacientes

No intuito de diminuir a influência de fatores sistêmicos na perda do implante,

foram excluídos do estudo pacientes fumantes, com AIDS ou com história de exposição prévia à radioterapia ou quimioterapia. Foram ainda excluídos pacientes que apresentaram intercorrência pós-operatória, como infecção, e pacientes que se submeteram a técnicas regenerativas prévias ou concomitantes à instalação dos implantes, como enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada. Essas informações foram obtidas através da ficha clínica de cada paciente, sendo de responsabilidade do cirurgião-dentista a coleta das mesmas, antes do procedimento cirúrgico, durante anamnese.

3.1.2. Critérios Determinantes de Falha dos Implantes

Tratando-se de um estudo retrospectivo, os pacientes que sofreram insucesso com o tratamento, perderam implantes durante o período cicatricial inicial, compreendido entre o momento de inserção do implante até o momento de instalação da prótese definitiva. Os implantes foram considerados perdidos nos casos de falência por mobilidade, radiolucidez periimplantar, dor ou presença de fibrose interfacial, sendo de responsabilidade do cirurgião dentista a informação das mesmas.

3.2. Análise de polimorfismos genéticos

3.2.1. Obtenção do DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, coletadas através de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos. O bochecho foi escolhido

como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA (TREVILATTO & LINE, 2000).

Esta solução foi imediatamente levada ao laboratório transportada em gelo. Foi adicionado a solução de glicose 1 ml de solução TNE (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl e 2 mM EDTA) e então centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, para coleta da fase celular. Para a suspensão das células, foi acrescentado 1,3 ml de solução de extração (Tris-Cl a 10 mM, (pH 7,8), EDTA a 5 mM e SDS a 0,5%) e as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de extração do DNA.

3.2.2. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de AIDAR & LINE, 2007. Resumidamente: depois de descongeladas as amostras foram incubadas *overnight* com 20 mg/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) a 56°C. Foram adicionados 500 µl de solução de Acetato de Amônio 10mM com EDTA 1mM e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 17000g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado e adicionados 540 µl de isopropanol para cada 900 µl da solução contendo DNA. Após centrifugação o pellet foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37°C. O DNA foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE (Tris-Cl a 10 mM (pH 7,8), EDTA a 1 mM) a temperatura ambiente por 3 horas. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator-*Pharmacia-Biotech*) e sua pureza estimada pela razão OD 260/280 (MANIATIS *et al.*, 1989).

3.2.3. .Reação de PCR

Reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram utilizadas para amplificação dos fragmentos das regiões reguladoras dos genes da MMP-3 e MMP-8. O oligonucleotídeo iniciador 5' (*primer forward*) do fragmento da MMP-3 contém uma troca de adenina para guanina na segunda base do final 3', para criar um sítio de restrição para enzima *Tth1111*, como descrito por LU *et al.* (2007).

A reação de PCR apresentou um volume final de 10 µl contendo aproximadamente 200 ng de DNA, *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos para cada fragmento e 1U de *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*). Uma mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial por 3 minutos. Em seguida, foram utilizados trinta e cinco ciclos com desnaturação a 95°C, anelamento a uma temperatura adequada para cada fragmento e extensão a 72°C, 1 minuto em cada temperatura. Os oligonucleotídeos iniciadores, temperatura de anelamento (amplificação), além do tamanho dos fragmentos gerados (pares de base - pb) estão descritos na Tabela 1.

3.2.4. Determinação do Genótipo

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por enzimas de restrição para gerar fragmentos menores (*RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism*). A digestão foi realizada com volume final de 6 µl, por 16 h a 37°C. A Tabela 1 apresenta as enzimas de restrição e os tamanhos dos fragmentos gerados.

Tabela 1: Condições da PCR e RFLP

SNP	Primers (5' – 3')	TA	RFLP	pb
MMP-3 (-1612)	F: GGTTCCTCCATTCCTTTGATGGGGGGAAAgA	53°C	<i>Tth1111</i>	129
	R: CTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT		37°C	97 + 32
MMP-8 (-799)	F: CAGAGACTCAAGTGGGA	52°C	<i>SfcI</i>	106
	R: TTTCATTTGTGGAGGGGC		37°C	74 + 32

(F: *Primer Forward*; R: *Primer Reverse*; TA: Temperatura de Anelamento; pb: pares de base)

3.2.5. Eletroforese

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis verticais de poliacrilamida a 10% em TBE 1x (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). Três microlitros de DNA amplificado ou dez microlitros do produto da reação de RFLP foram utilizados para eletroforese. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 20mA, sendo o tempo de corrida variável de acordo com o tamanho do fragmento. Como padrão foi utilizado o marcador de massa molecular ϕ X174-RF *HaeIII* DNA *digest* ou outro marcador disponível. Para visualização das bandas de DNA os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados em aparelho de análise de imagens *Chemidoc – XRS* e software *Quantity One – SW* (BioRad).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A associação entre polimorfismos genéticos e o grau de predisposição a perda precoce de implantes osseointegrados foi avaliado através do Teste Qui-Quadrado, ao nível de significância de 5%. O programa ARLEQUIN (v. 2.0 – SCHNEIDER *et al.*, 2000) foi utilizado para verificar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

5. RESULTADOS

5.1. Amostras

Foi obtido DNA de 202 pacientes não fumantes em bom estado de saúde geral, que realizaram tratamento com implante dental osseointegrado, utilizando o Sistema Branemark, sem apresentarem intercorrência pós-operatória ou terem se submetido a técnicas regenerativas, obtendo sucesso ou falha na osseointegração.

A idade e o gênero dos indivíduos foram pareados para não haver diferença estatística significativa ($p>0.05$) entre os grupos estudados (Tabela 2).

No grupo controle 425 implantes foram colocados com sucesso, apresentando uma média de 4,2 implantes por paciente (variação de 1 a 14 implantes). Enquanto no grupo teste 534 implantes foram instalados, média de 5,3 implantes por paciente (variação de 1 a 14 implantes), sendo 153 perdidos média de 1,5 implantes por paciente (variação de 1 a 5 implantes perdidos) (Tabela 2).

Tabela 2: Média de idade, frequência de gênero dos indivíduos e número total de implantes colocados e perdidos nos dois grupos estudados.

Parâmetros	Grupo Controle (n=101)	Grupo Teste (n=101)
Média de idade	51 / 18-80	51 / 18-80
Gênero		
Feminino	66% (68/101)	66% (68/101)
Masculino	33% (33/101)	33% (33/101)
Implantes Colocados	423/ 1-14	534/ 1-14
Implantes Perdidos	-	153/ 1-5

5.2. MMP-3

O polimorfismo estudado no gene da MMP-3 se caracteriza por apresentar uma variação na sequência de adenina na posição -1612, resultando no alelo 5A ou 6A (rs3025058). O alelo 5A parece aumentar a atividade e transcrição da MMP-3, e enquanto o alelo 6A diminuir (YE *et al.*, 1996). A enzima de restrição *Tth111* reconhece o alelo 5A, e na presença desse o produto de PCR (129 pares de bases) é digerido em duas parte (97 e 32 pares de bases). Na eletroforese, o alelo 6A foi representado por uma banda de DNA de 129 pares de bases, o alelo 5A foi representado por uma banda de DNA de 97 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (129 e 97 pares de bases). Durante a eletroforese a banda com 32 pares de bases saía do gel. A figura 2 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-3 (-1612), caracterizando os diferentes genótipos.

Figura 2 – Genótipos da MMP-3



Legenda: 1, 3, 4 = Genótipo 5A/6A

2 = Genótipo 6A/6A

5 = Genótipo 5A/5A

Para esse polimorfismo 97 amostras controle e 92 amostras teste foram analisadas, sendo que as demais amostras apresentaram algum erro de reação e foram excluídas.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência genotípica ($p=0,23$) e na frequência alélica ($p=0,24$) do polimorfismo MMP-3 (-1612) entre 5A e 6A.

O resultado mostra que em ambos os grupos a maior frequência foi do alelo 6A (60,8% dos pacientes que compuseram o grupo controle e 54,9% dos pacientes do grupo teste) e do genótipo 5A/6A (51,5% do grupo controle e 62,0% do grupo teste), sugerindo que esse polimorfismo não está influenciando o processo de osseointegração da população analisada.

As frequências alélicas e genotípicas do gene da MMP-3 estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-3.

MMP-3 (-1612)	Grupo Controle		Grupo Teste		Qui- Quadrado
	n	%	n	%	
Alelos	n = 194		n = 184		
5A	76	39,2	83	45,1	p = 0,24
6A	118	60,8	101	54,9	
Genótipo	n = 97		n = 92		
5A/5A	13	13,4	13	14,1	p = 0,23
5A/6A	50	51,5	57	62,0	
6A/6A	34	35,1	22	23,9	

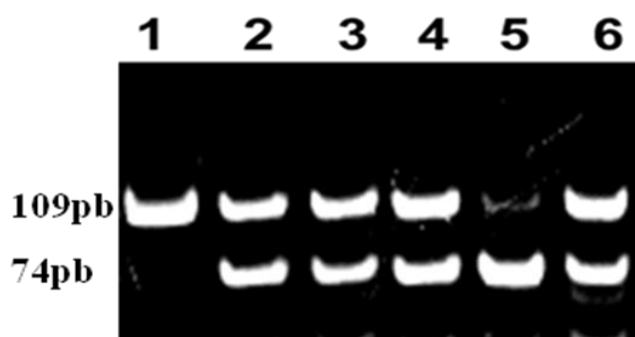
5.3. MMP-8

Na posição -799 o polimorfismo se caracteriza por uma troca de citosina por timina (rs11225395), apresentando dois alelos diferentes (C ou T). Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados durante esse trabalho foram eficientes na amplificação do fragmento e a enzima de restrição *SfcI* cliva o produto de PCR em dois fragmentos quando o site polimórfico contém alelo C (mas não T).

Na eletroforese, o alelo C foi representado por uma banda de DNA de 106 pares de bases, o alelo T foi representado por uma banda de DNA de 74 pares de bases, enquanto o heterozigoto apresentou uma combinação de ambos os alelos (106 e 74 pares de bases).

A Figura 3 mostra os fragmentos amplificados e digeridos da MMP-8 (-799), caracterizando cada genótipo.

Figura 3 Genótipos de MMP-8



Legenda: 1 = Genótipo T/T

2, 3, 4 e 6 = Genótipo C/T

5 = Genótipo C/C

Para esse polimorfismo 100 amostras controle 80 amostras teste foram analisadas. A análise do polimorfismo -799 do gene da MMP-8 indica que enquanto o grupo controle apresenta alta frequência do genótipo C/T, o grupo teste apresenta maior taxa do genótipo T/T; sugerindo que esse último pode estar relacionado com um risco maior de falhas nos processos de osseointegração. A análise estatística mostra que tanto o alelo T, em 76,25% no grupo teste, quanto o genótipo T/T, em 63,75% do mesmo grupo, predisõem a perda precoce de implantes osseointegrados, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Frequência dos diferentes alelos e genótipos do gene da MMP-8.

MMP-8 (-799)	Grupo Controle		Grupo Teste		Qui- Quadrado
	n	%	n	%	
Alelos	n = 200		n = 160		
C	80	40,0	38	23,75	p = 0,0011
T	120	60,0	112	76,25	
Genótipo	n = 100		n = 80		
C/C	16	16,0	09	11,25	p = 0,0009
C/T	48	48,0	20	25,00	
T/T	36	36,0	51	63,75	

6. DISCUSSÃO

A perda de implantes dentais está relacionada com diversos fatores, tais como o tabagismo (BAIG & RAJAN 2007), quantidade e densidade ósseas (JAFFIN & BERMAN, 1991; BRYANT, 1998; STANFORD, 1999; MOUHYI *et al.*, 2009), diabetes (SHERNOFF *et al.*, 1994; ABDULWASSIE & DHANRAJANI, 2002), tratamento quimioterápico (SCHON *et al.*, 1996), resposta imune debilitada (ESPOSITO *et al.*, 1998; KRONSTROM *et al.*, 2000), força excessiva na instalação do transmucoso (FRIBERG *et al.*, 1991; ASKARY *et al.*, 1999a) entre outros. Entretanto, um pequeno número de perdas ocorre sem causas clinicamente reconhecidas (DEAS *et al.*, 2002). Somado a isso, o fenômeno em cacho ou clusterização, onde indivíduos que perderam um implante são mais propensos a sofrerem outras perdas (WEYANT & BURN, 1993; HUTTON *et al.*, 1995; TONETTI, 2000), sugere que fatores intrínsecos ao hospedeiro podem dificultar a osseointegração.

Nesse sentido, a relação entre polimorfismos genéticos e perda de implantes vem sendo estudada e parece responder algumas questões. De fato, polimorfismos genéticos estão associados a uma suscetibilidade individual de falha na osseointegração (SANTOS *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2008; MONTES *et al.*, 2009).

O presente estudo obteve um banco de DNA de 202 pacientes não fumantes em bom estado de saúde geral, que realizaram tratamento com implante dental osseointegrado, utilizando o Sistema Branemark, sem apresentarem intercorrência pós-operatória ou terem se submetido a técnicas regenerativas, obtendo sucesso ou falha na osseointegração. Esse banco apresenta rígidos critérios na obtenção das amostras, visando diminuir a influência de fatores sistêmicos na perda do implante. Através desse banco, o estudo da influência de polimorfismos genéticos em diferentes genes

relacionados à osseointegração poderá ser realizado, possibilitando descobertas de novos marcadores moleculares relacionados à perda de implantes.

Nesse estudo a análise relacionada ao polimorfismo -1612 do gene da MMP-3 mostra que em ambos os grupos o alelo 6A e o genótipo 5A/6A são os mais frequentes, sugerindo que apesar de modificar a expressão da respectiva proteína, esse polimorfismo parece não influenciar ou ter somente um efeito mínimo na falha de implantes osseointegrados.

É importante considerar que a transcrição de genes de MMPs pode ser regulada por diversos fatores locais como citocinas, hormônios e fatores de crescimento, metabólitos de bactérias, moléculas de adesão e outros. Além disso, estudos mostram que em camundongos *knockout* para diferentes MMPs, inclusive MMP-3, não ocorre qualquer distúrbio aparente (ZHOU *et al.*, 2000), que remete a funções compartilhadas de algumas MMPs, indicando que o polimorfismo de um único gene de MMP pode não ter efeito suficiente na susceptibilidade a doença bem como a falhas do processo de osseointegração.

Outra explicação seria que esse polimorfismo pode ter seus efeitos mascarados por polimorfismos em diferentes regiões do mesmo gene ou em outros genes que participam da complexa rede de mediadores inflamatórios da região periodontal. Dessa maneira, somente a presença do polimorfismo -1612 da MMP-3 não é um fator de risco genético para perda precoce de implantes.

Em relação ao polimorfismo C-799T do gene da MMP-8, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados durante esse estudo foram eficientes na amplificação do fragmento que contém o sítio polimórfico e a enzima de restrição *SfcI* cliva o produto de PCR em dois fragmentos quando o sítio polimórfico contém alelo C (mas não T). Dessa forma, a técnica de PCR e RFLP mostraram-se eficaz para o estudo desse polimorfismo.

O presente estudo ainda mostrou que polimorfismo na região promotora da MMP-8 na posição C-799T (WANG *et al.*, 2004), apresenta um polimorfismo funcional associado a perda precoce do implante. O alelo T (76.25%) e o genótipo T/T (63.75%) foram observados numa frequência maior no grupo teste, portanto esse polimorfismo pode se usado com marcador para avaliar pacientes com risco de perda de implante, onde a presença do alelo T indicaria um risco maior a falhas na osseointegração.

Uma vez que o colágeno tipo I é o componente principal da matriz extracelular da gengiva, do ligamento periodontal e do osso alveolar, a degradação deste é considerada um dos fatores-chave nas lesões destrutivas descontroladas, seja durante a periodontite, periimplantite ou perda de implante (SORSA *et al.*, 2006; KINNEY *et al.*, 2007). As principais MMPs colagenolíticas associadas com a gravidade da inflamação periodontal são colagenase-2 (MMP- 8) e colagenase-3 (MMP-13) (KIILI *et al.*, 2002, SORSA *et al.*, 2004; SORSA *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2007), sendo que a MMP-8 se mostra mais eficiente para iniciar a degradação do colágeno tipo I (SORSA *et al.*, 2006). Embora esta MMP exerça seu papel principal na degradação da matriz, ela também pode modular a resposta inflamatória e imune (KUULA *et al.*, 2009; KORPI *et al.*, 2009). O desequilíbrio na produção da MMP-8 em paciente com o alelo T fornece a base molecular para explicar uma intensa degradação do colágeno tipo I e uma resposta inflamatória exacerbada, criando condições que dificultam a osseointegração e dessa forma justificando o aumento na susceptibilidade a perda de implantes.

Os inibidores de MMPs de baixo peso molecular, os chamados MMPIs, podem ter um potencial terapêutico para evitar que esses pacientes apresentem falhas no processo de osseointegração. Vários estudos em humanos e animais têm demonstrado que os níveis de MMP-8 associados à inflamação e destruição do tecido periodontal são sensíveis a inibição por uma dose subantimicrobial de doxiciclina (LEE *et al.*, 2004;

EMINGIL *et al.*, 2004; PRESSHAW *et al.*, 2004a; PRESSHAW *et al.*, 2004b). Doxíciclina por si só reduziu as atividades da MMP-8 e quando combinada com baixa dose de flurbiprofeno, um antiinflamatório não esteroide, produz uma redução drástica dessa MMP (LEE *et al.*, 2004). Essa redução diminuiu a degradação do colágeno tipo I e também a reabsorção óssea (SORSA *et al.*, 2011) e poderia favorecer o processo de osseointegração.

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

Na verdade, na osseointegração, como em qualquer processo multifatorial (MICHALOWICZ *et al.*, 2000), parece ser a combinação de vários polimorfismos de risco significativo agindo sinergicamente que eleva a suscetibilidade à falha. Alguns sítios polimórficos podem ser herdados em combinação, são os chamados haplótipos, os quais fornecem informações mais completas e confiáveis da influência dos polimorfismos no genótipo do processo. Nesse sentido a análise das frequências de haplótipos e os resultados de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos da MMP-1, MMP-3 e MMP-8, os quais estão localizados no cromossomo 11q22.3 adjacentes uns aos outros, parece ser de grande valor para compreensão da osseointegração e dos mecanismos de compensação funcional do indivíduo.

Uma vez que as MMPs têm um papel chave no processo de osseointegração e que a descoberta de marcadores genéticos relacionados à perda de implantes possibilita a identificação de indivíduos susceptíveis ao insucesso; a análise de polimorfismos em MMPs relacionados à osseointegração é de um valor clínico inestimável. Uma vez que uma seleção mais criteriosa poderia ser realizada e, no futuro, estratégias de prevenção e

terapêutica individualizada poderiam ser desenvolvidas, como por exemplo, o uso de MMPIs.

Nesse sentido, mais estudos são necessários para investigar outros marcadores genéticos para suscetibilidade à perda de implantes e assim contribuir para o prognóstico do tratamento. No futuro, avaliações de diagnóstico através de genes de risco podem ser uma garantia para aumentar a taxa de sucesso dos implantes dentários.

7. CONCLUSÕES

- Foi obtido um banco de DNA de 202 pacientes não fumantes em bom estado de saúde geral, que realizaram tratamento com implante dental osseointegrado, utilizando o Sistema Branemark, sem apresentarem intercorrência pós-operatória ou terem se submetido a técnicas regenerativas, obtendo sucesso ou falha na osseointegração. Esse banco possibilitará futuros estudos analisando diferentes marcadores moleculares relacionados à osseointegração.
- O polimorfismo na posição -799 do gene da MMP-8 está associado com perda precoce de implantes osseointegrados na população estudada. Os resultados apresentados sugerem um papel ativo da MMP-8 na patogênese da falha de implante, onde indivíduos com o alelo T parecem ter um risco maior a perder implante.
- O polimorfismo estudado no gene da MMP-3 (-1612) parece não estar associado com a perda precoce de implantes osseointegrados, não sendo um bom marcador genético de susceptibilidade a falha na osseointegração.

8. REFERÊNCIAS

1. ABDULWASSIE & DHANRAJANI PJ. Diabetes Mellitus and Dental Implants: A Clinical Study. **Implant Dent.** 2002 ; 11: 83-86.
2. AIDAR M, LINE SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Braz Dent J.** 2007; 18: 148-152
3. ALBREKTSSON, T. Direct bone anchorage of dental implants. **J Prosthet Dent.** 1983; 50: 255–261.
4. ALBREKTSSON, T., JANSSON, T. & LEKHOLM, U. Osseointegrated dental implants. **Dent Clin North Am.** 1986; 30: 151–174.
5. APSE P, ELLEN RP, OVERALL CM, ZARB GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. **J Periodontal Res.** 1989; 24: 96-105.
6. ASKARY AS, MEFFERT RM, GRIFFIN T. Why do dental implants fail? Part I. **Implant Dent.** 1999a; 8: 173-185.
7. ASKARY AS, MEFFERT RM, GRIFFIN T. Why do dental implants fail? Part II. **Implant Dent.** 1999b; 8: 265-277.
8. ASTOLFI CM, SHINOHARA AL, DA SILVA RA, SANTOS MC, LINE SR, DE SOUZA AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. **J Clin Periodontol.** 2006; 33: 699-703.
9. BAIG MR & RAJAN M. Effects of smoking on the outcome of implant treatment: A literature review. **Indian J Dent Res.** 2007; 18: 190-195.
10. BARLAS IO, SEZGIN M, ERDAL ME, SAHIN G, ANKARALI HC, Altintas ZM, TURKMAN E. Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix

metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). **Rheumatol Int.** 2009;29:383-388.

11. BASSET P, OKADA A, CHENARD MP, KANNAN R, STOLL I, ANGLARD, P.BELLOCQ JP, RIO MC. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. **Matrix Biol.** 1997; 15: 535–541.

12. BEKLEN A, TÜTER G, SORSA T, HANEMAAIJER R, VIRTANEN I, TERVAHARTIALA T, KONTTINEN YT. Gingival tissue and crevicular fluid co-operation in adult periodontitis. **J Dent Res.** 2006; 85: 59-63.

13. BEYZADE S, ZHANG S, WONGYK, DAY IN, ERIKSSON P, YE S. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol.** 2003; 41: 2130–2137.

14. BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL-HANSEN B, DECARLO A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1993; 4: 197-250.

15. BRAMHALL SR, NEOPTOLEMOS JP, STAMP GW, LEMOINE NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. **J Pathol.** 1997; 182: 347-355.

16. BRANEMARK P-I, LAUSMAA J, ERICSON L, THOMSEN P, BRANEMARK R, SHALAK R. Anatomy of osseointegration and the transfer of load. In: Fonseca RJ, Davis WH. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery.** Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995. 6. 165-224.

17. BRANEMARK R. A biomechanical study of osseointegration. In-vivo measurements in rat, rabbit, dog and man. Göteborg: Göteborg University, 1996.

18. BRYANT SR. The effects of age, jaw site, and bone condition on oral implant outcomes. **Int J Prosthodont.** 1998; 5: 450-470.
19. BULLARD KM, LUND L, MUDGETT JS, et al., Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. **Ann. Surg.** 1999; 230: 260-265.
20. BUTTICE G, QUINONES S, KURKINEN M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of human stromelysin gene. **Nucleic Acids Res.** 1991; 19:3723-31.
Cancer Res. 2005; 11:594-599.
21. CARGILL M, ALSHULER D, IRELAND J, SKLAR P, DALEY GQ & LANDER ES. Characterization of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes. **Nat Genet.** 1999; 22: 231-238.
22. CHAUDHARY AK, SINGH M, BHARTI AC, SINGH M, SHUKLA S, SINGH AK, MEHROTRA R. Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter (-1171 5A->6A) polymorphism in oral submucous fibrosis and head and neck lesions. **BMC Cancer.** 2010; 10: 369.
23. CHEN HY, COX SW, ELEY BM, MÄNTYLÄ P, RÖNKÄ H, SORSA T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. **J Clin Periodontol.** 2000; 27: 366-369.
24. CHEN ST, WILSON TG, Jr, HAMMERLE CH. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures, and outcomes. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2004;19:12-25.
25. COLE AA, CHUBINSKAYA S, SCHUMACHER B, HUCH K, SZABO G, YAO J, MIKECZ K, HASTY KA, KUETTNER KE. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. **J Biol Chem.** 1996; 271: 11023-11026.

26. CONG Y, GUO X, LIU X, CAO D, JIA X, XIAO X, LI S, FANG S, ZHANG Q. Association of the single nucleotide polymorphisms in the extracellular matrix metalloprotease-9 gene with PACG in southern China. **Mol Vis.** 2009; 15:1412-1417.
27. CONSTANTIN A, LAUWERS-CANCÈS V, NAVAUX F, ET AL. Stromelysin 1 (Matrix Metalloproteinase 3) and HLA-DRB1 Gene Polymorphisms -Association With Severity and Progression of Rheumatoid Arthritis in a Prospective Study. **Arthritis Rheum.** 2002; 46: 1754-62.
28. COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Patologia Estrutural e Funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A.; 1999. 79-100.
29. COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL. Inflammation and Repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. **Pathologic basis of Disease.** 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994. 51-92
30. DEAS DE, MIKOTOWICZ JJ, MACKEY SA, MORITZ AJ. Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports. **Implant Dent.** 2002; 11: 235-242.
31. DECOCK J, LONG JR, LAXTON RC, SHU XO, HODGKINSON C, HENDRICKX W, PEARCE EG, GAO YT, PEREIRA AC, PARIDAENS R, ZHENG W, YE S. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. **Cancer Res.** 2007; 67: 10214-10221.
32. DI COLANDREA T, WANG L, WILLE J, D'ARMIENTO J, CHADA KK. Epidermal expression of collagenase delays wound-healing in transgenic mice. **J. Invest. Dermatol.** 1998; 111: 1029-1033.
33. DIOSZEGI M, CANNON P, VAN WART H. Vertebrate Collagenases. **Methods Enzymol.** 1995; 248: 413-449.

34. DJURIĆ T, ZIVKOVIĆ M, RADAK D, JEKIĆ D, RADAK S, STOJKOVIĆ L, RAICEVIĆ R, STANKOVIĆ A, ALAVANTIĆ D. Association of MMP-3 5A/6A gene polymorphism with susceptibility to carotid atherosclerosis. **Clin Biochem.** 2008; 41: 1326-1329.
35. DJURIĆ T, ZIVKOVIĆ M, STANKOVIĆ A, MECANIN S, ALAVANTIĆ D. Endothelial NOS G894 T and MMP-3 5A/6A gene polymorphisms and hypertension in Serbian population. **J Clin Lab Anal.** 2005; 19: 241-246.
36. EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer.** 2002; 2: 161–174.
37. EKFEJDT A, CHRISTIANSSON U, ERIKSSON T, LINDEN U, LUNDQVIST S, RUNDCRANTZ T, JOHASSON LA, NILNER K, BILLSTROM C. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. **Clin Oral Implants Res.** 2001; 12: 462-467.
38. EMINGIL G, ATILLA G, SORSA T, LUOTO H, KIRILMAZ L. & BAYLAS H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. **J Periodont.** 2004; 75, 106-115.
39. EMONARD H, GRIMAUD J-A. Matrix Metalloproteinases. **Cell Molec Biol.** 1990; 36: 131-153.
40. ESPOSITO M, HIRSCH JM, LEKHOLM U, THOMPSEN P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). **Etiopathogenesis. Eur J Oral Sci.** 1998; 106: 721-764.
41. ESPOSITO M, THOMPSEN P, ERICSON LE, LEKHOLM U. Histopathologic observations on early oral implant failures. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1999; 14: 798-810.

42. ESPOSITO MA, KOUKOULOPOULU A, COULTHARD P, WORTHINGTON HV. Interventions for replacing missing teeth: dental implants in fresh extraction sockets (immediate, immediate-delayed and delayed implants). **Cochrane Database Syst Ver.** 2006. 18: 360-366.
43. FALLAH, S., SEIFI, M., SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Risk of coronary artery stenosis in Iranian type 2 diabetics: is there a role for matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism? **J. Physiol Biochem.** 2010; 66: 359 – 364.
44. FERNANDES KS, BRUM DG, SANDRIM VC, GUERREIRO CT, BARREIRA AA, TANUS-SANTOS JE. Matrix metalloproteinase-9 genotypes and haplotypes are associated with multiple sclerosis and with the degree of disability of the disease. **J Neuroimmunol.** 2009; 214:128-131.
45. FRIBERG B, JEMT T, LEKHOLM U. Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1991; 6: 142-146.
46. FU, C., XING, Y., SONG, X. The association of the metalloproteinase-3 gene promoter polymorphism and the middle cerebral artery stenosis. **Cell Biochem Biophys.** 2010; 8: 120-131.
47. GAI X, LAN X, LUO Z, WANG F, LIANG Y, ZHANG H, ZHANG W, HOU J, HUANG M. Association of MMP-9 gene polymorphisms with atrial fibrillation in hypertensive heart disease patients. **Clin Chim Acta.** 2009; 408:105-109.
48. GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARKMW, LIBBY P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest.** 1994; 94: 2493–2503.
49. GHADERIAN SM, NAJAR RA, PANAHA AS, REZAIIE G, FERIMANI AR, HARCHEGANI AB, AZARGASHB E. Matrix metalloproteinase: investigation from

gene to protein as effective factor in myocardial infarction. **J Thrombosis and Thrombolysis** . 2010; 30: 404-1011.

50. GREENSTEIN G, HART TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. **J Am Dent Assoc**. 2002; 133: 452-459.

51. GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ A, FUEYO A, FOLGUERAS AR, GARABAYA C, PENNINGTON CJ, PILGRIM S, EDWARDS DR, HOLLIDAY DL, JONES JL, SPAN PN, SWEEP FC, PUENTE XS, LÓPEZ-OTÍN C. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. **Cancer Res**. 2008; 68: 2755-2763.

52. HALL NF, GALE CR, YE S, MARTYN CN. Myopia and polymorphisms in genes for matrix metalloproteinases. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2009; 50: 2632-2636.

53. HAMMERLE CH, CHEN ST, WILSON TG, Jr. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding the placement of implants in extraction sockets. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2004; 19:26-28.

54. HENNEY AM, WAKELEY PR, DAVIES MJ, FOSTER K, HEMBRY R, MURPHY G, HUMPHRIES S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci**. 1991; 88: 8154-8158.

55. HENRY, P.J. Oral implant restoration for enhanced oral function. **Clip Exp Pharmacol Physiol**. 2005; 32: 123-127.

56. HERMAN MP, SUKHOVA GK, LIBBY P, GERDES N, TANG N, HORTON DB, KILBRIDE M, BREITBART RE, CHUN M, SCHÖNBECK U. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel

collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. **Circulation**. 2001; 104: 1899-18904.

57. HERNÁNDEZ M, MARTINEZ B, TEJERINA JM, VALENZUELA MA, GAMONAL J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2007; 34: 729–735.

58. HIRASHIKI A, YAMADA Y, MURASE Y. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low- or high-risk subjects defined by conventional risk factors. **J Am Coll Cardiol**. 2003; 42: 1429-1437.

59. HOLM-PEDERSEN, P., LANG, N.P. & MULLER, F. What are the longitives of teeth and oral implants? **Clin Oral Implants**. 2007; 18 suppl 3: 15 – 19.

60. HUNG TM, CHANG SC, YU WH, WANG YW, HUANG C, LU SC, LEE PH, CHANG MF. A novel nonsynonymous variant of matrix metalloproteinase-7 confers risk of liver cirrhosis. **Hepatology**. 2009; 50:1184-93.

61. HUTTON JE, HEATH MR, CHAI JY, HARNETT J, HEMT T, JOHNS RB, MCKENNA S, MCNAMARA DC, VAN STEENBERGHE D, TAYLOR R, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1995; 10: 33-42.

62. INGMAN T, KONONEN M, KONTTINEN YT, SIIRILA HS, SUOMALAINEN K, SORSA T. Collagenase, gelatinase and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implants and natural teeth. **J Clin Periodontol**. 1994; 21: 301-307.

63. ITO A, MUKAIYAMA A, ITOH Y, et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**. 1996; 271:14657-60.

64. JAFFIN RA & BERMAN CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. **J Periodontology**. 1991; 46: 2-4.

65. JEMT, T. & HAGER, P. Early complete failures of fixed implant-supported prostheses in the edentulous maxilla: a 3-year analysis of 17 consecutive cluster failure patients. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2006; 8: 77–86.
66. JOHNSEN M, LUND LR, ROMER J, ALMHOLDT K, DANO K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Curr Opin Cell Biol.** 1998; 10: 667–671.
67. KÄHÄRI VM, SAARIALHO-KERE U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Ann Med.** 1999; 31: 34-45.
68. KARA I, OZKOK E, AYDIN M. Combined effects of ACE and MMP-3 polymorphisms on migraine development. **Cephalalgia;** 2007; 27: 235-243.
69. KASEMO B, LAUSMAA J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1988; 3: 247-259.
70. KIILI M, COX SW, CHEN HY, WAHLGREN J, MAISI P, ELEY BM, SALO T, SORSA T. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. **J Clin Periodontol.** 2002; 29: 224-232.
71. KINNEY JS, RAMSEIER CA, GIANNOBILE WV. Oral fluidbased biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. **Ann NY Acad Sci.** 2007; 1098: 230–251.
72. KIVELA-RAJAMAKI M, MAISI P, SRINIVAS R, TERVAHARTIALA T, TERONEN O, HUSA V, SALO T, SORSA T. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. **J Periodontal Res.** 2003; 38: 583-590.
73. KNAUPER V, OSTHUES A, DECLERCK YA, LANGLEY KE, BLASER J, TSCHEESCHE H. Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase. **Biochem J.** 1993; 291; 847-854.

74. KNOX JB, SUKHOVA GK, WHITTEMORE AD, LIBBY P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. **Circulation**. 1997; 95: 205-212.
75. KOH YS, CHANG K, KIM PJ, SEUNG KB, BAEK SH, SHIN WS, LIM SH, KIM JH, CHOI KB. A close relationship between functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**. 2007; 127: 430-432.
76. KÖHRMANN A, KAMMERER U, KAPP M, DIETL J, ANACKER J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC Cancer**. 2006. 16; 90:188.
79. KORPI JT, ASTRÖM P, LEHTONEN N, TJÄDERHANE L, KALLIO-PULKKINEN S, SIPONEN M, SORSA T, PIRILÄ E, SALO T. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. **Eur J Oral Sci**. 2009; 117:248-254.
80. KRONSTROM M, SVENSSON B, ERICKSON E, HOUSTON L, BRAHAM P, PERSSON GR. Humoral immunity host factors in subjects with failing or successful titanium dental implants. **J Clin Periodontol**. 2000; 27: 875-882.
81. KUMAR MS, VAMSI G, SRIPRIYA R, SEHGAL PK. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-8 and -9) in chronic periodontitis patients with and without diabetes mellitus. **J Periodontol**. 2006; 77: 1803-1808.
82. KUSUKAWA J, SASAGURI Y, MORIMATSU M, KAMEYAMA T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J Oral Maxillofac Surg**. 1995; 53: 530-534.
83. KUULA H, SALO T, PIRILA E, HAGSTROM J, LOUMANEN M, GUTIERREZ-FERNANDEZ A, ROMANOS GE, SORSA T. Human beta-defensin-1 and -2 and

matrix metalloproteinase-25 and -26 expression in chronic and aggressive periodontitis and in peri-implantitis. **Arch Oral Biol.** 2008; 53: 175-86.

84. LAXTON RC, HU Y, DUCHENE J, ZHANG F, ZHANG Z, LEUNG KI, XIAO Q, SCOTLAND RS, HODGKINSON C, SMITH K, WILLET J, LÓPEZ C, SIMPSON, A, KIECHL S, AHLUWALIA A, XU Q & YE S. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. **Circulation Research.** 2009; 105; 921-929.

85. LEE HM, CIANCIO SG, TÜTER G, RYAN ME, KOMAROFF E, GOLUB LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J Periodontal,** 2004; 75:453-463.

86. LEE J, KIM HR, MIN JW, PARK JS, JIN SM, HAN SK, SHIM YS, YIM JJ. Lack of association between matrix metalloproteinase 8 promoter polymorphism and bronchiectasis in Koreans. **J Korean Med Sci.** 2007; 22: 667-671.

87. LEE, J.H., FRIAS, V., LEE, K.W. & WRIGHT, R.F. Effect of implant size and shape on implant success rates: a literature review. **J Prosthet Dent.** 2005; 94: 377–381.

88. LEITE MFF, SANTOS MCLG, SOUZA AP, LINE SRP. Osseintegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2008; 23: 653-658.

89. LEKHOLM U, GUNNE J, HENRY P, HIGUCHI K, LINDEN U, BERGSTROM C, VAN STEENBERGHE D. Survival of the Branemark implant in partially edentulous jaws: a 0-10 year prospective multicenter study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 1999; 14: 639-645.

90. LEONG DJ, GU XI, LI Y, et al. Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. **Matrix Biol.** 2010; 29: 420-426.
91. LEVIN, L. Dealing with dental implants failures. **J Appl Oral Sci.** 2008; 171-175.
92. LI H, ZHANG ZS, LIU W, YANG WZ, DONG ZN, MA MJ, HAN C, YANG H, CAO WC, DUAN L. Association of a functional polymorphism in the MMP-3 gene with Moyamoya Disease in the Chinese Han population. **Cerebrovasc Dis.** 2010; 30(6): 618-625.
93. LINDHE J. **Tratado de periodontologia clínica e implantodontia oral.** 1. 4^a ed. Guanabara Koogan; 2005.
94. LOMBARDI F, BELLETTI I, BARTEZZATI S, PIER M, PACCIOLLA M, BIONDI MS. MMP-1 and MMP-3 polymorphism and arrhythmia recurrence after electrical cardioversion in patients with persistent atrial fibrillation. **J Cardiovascular Medicine.** 2011; 12: 37-42.
95. LU Z, CAO Y, WANG Y, ZHANG Q, ZHANG X, WANG S, LI Y, XIE H, JIAO B, ZHANG J. Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9 promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. **J Neurooncol.** 2007; 85:65-73.
96. MADICH I, HELLMING S, SCHREIBER S, BETHKE B, STOLTE M, MIEHLKE S. Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis. *Inflammatory Bowel Diseases.* 2011; 234: 142-154.
97. MADLENER M, PARKS WC, WERNER S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp Cell Res.** 1998; 242: 201-210.
98. MICHALOWICZ BS, DIEHL SR, GUNSOLLEY JC, SPARKS BS, BROOKS CN, KOERTGE KE. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. **J**

Periodontol. 2000; 71: 1699-1707.

99. MOILANEN M, PIRILÄ E, GRÉNMAN R, SORSA T, SALO T. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol.** 2002; 197: 72-81.

100. MONTES CC, ALVIM-PEREIRA F, DE CASTILHOS BB, SAKURAI ML, 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: 208-217.

101. MONTES CC, PEREIRA FA, THOME G, ALVES ED, ACEDO RV, de SOUZA JR, MELO AC, TREVILATTO PC. Failing factors associated with osseointegrated dental implant loss. **Implant Dent.** 2007; 16: 404-12.

102. MOUHYI J, DOHAN EHRENFEST D M & ALBREKTSSON T. The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2009; 75: 145-156.

103. MOURANT AE, KOPEC AC, DOMANIEWSKA-SOBCZAK K. The distribution of the Human Blood Groups. **Oxford University Press.** 1976.

104. NAM SI, YU GI, KIM HJ, PARK KO, CHUNG JH, HA E, SHIN DH. A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1. **Laryngoscope.** 2011; 121(1): 171-175.

105. NEWMAN KM, OGATA Y, MALON AM, IRIZARRY E, GANDHI RH, NAGASE H, TILSON MD. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. **Arterioscler Thromb.** 1994; 14: 1315-1320.

106. NOMURA T, ISHII A, SHIMIZU H, TAGUCHI N, YOSHIE H, KUSAKARI H, HARA K. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-1 and -8, and collagenase activity levels in peri-implant crevicular fluid after implantation. **Clin Oral Implants Res.** 2000; 11: 430-440.
107. OKADA Y, NAKA K, KAWAMURA K, MATSUMOTO T, NAKANISHI I, FUJIMOTO N, SATO H, SEIKI M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest.** 1995; 72: 311-322.
108. OZKÖK E, AYDIN M, BABALIK E, OZBEK Z, INCE N, KARA I. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish patients. **Med Sci Monit.** 2008; 14:36-542.
109. PALOSAARI H, WAHLGREN J, LARMAS M, RÖNKÄ H, SORSA T, SALO T, TJÄDERHANE L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. **J Dent Res.** 2000; 79: 77-84.
110. PARK KS, KIM SJ, KIM KH, KIM JC. Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. **J Gastroenterol Hepatol.** 2011; 26(2): 391-397.
111. PARK KS, KIM SJ, KIM KO, KIM JC., Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer. **Gastroenrelogogy and Hepatology J.** 2011; 26: 391-397.
112. PIATELLI, A., SCARANO, A., FAVERO, L., IEZZI, G., PETRONE, G. & FAVERO, G.A. (2003) Clinical and histologic aspects of dental implants removed due to mobility. **J Periodontol.** 2003; 74: 385-390.
113. PINTO AVS, MYEAGUSKO JM, RAMALHO AS, WASSAL, T, PEREIRA LAV. Fatores de risco, complicações e fracassos na terapêutica com implantes

osseointegrados. **In: Feller, Christa; Gorab, Riad. Atualização na clínica odontológica:** módulos de atualização. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.133-216.

114.PIRILÄ E, RAMAMURTHY NS, SORSA T, SALO T, HIETANEN J, MAISI P. Gelatinase A (MMP-2), collagenase-2 (MMP-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). **Dig Dis Sci.** 2003; 48: 93-98.

115.PORTER, J.A. & VON FRAUNHOFER, J.A. Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. **General Dentistry.** 2005; 53: 423–432.

116.PRESHAW, P. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, 2004a; 31, 697-707.

117. PRESHAW, P. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, 2004b; 31, 697-707.

118.PRIKK K, MAISI P, PIRILÄ E, SEPPER R, SALO T, WAHLGREN J, SORSA T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. **J Pathol.** 2001; 194: 232-238.

119. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol.** 2007; 26: 587–596.

120.RODERFELD M, RATH T, SCHULZ R, SEEGER W, TSCHUSCHNER A, GRAF J, ROEB E. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. **J Cyst Fibros.** 2009; 8: 338-347.

121.ROMÁN-GARCÍA P, COTO E, REGUERO JR, CANNATA-ANDÍA JB, LOZANO I, AVANZAS P, MORÍS C, RODRÍGUEZ I. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. **Coron Artery Dis.** 2009; 20: 383-386.

- 122.SANTOS MC, CAMPOS MI, SOUZA AP, TREVILATTO PC, LINE SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2004; 19: 38-43.
- 123.SANTUS P, CASANOVA F, BIONDI ML, BLASI F, DI MARCO F, CENTANNI S. Stromelysin-1 polymorphism as a new potential risk factor in progression of chronic obstructive pulmonary disease. **Monaldi Arch Chest Dis**. 2009; 71: 15-20.
- 124.SCHOEREDER A, POHLER O, SUTTER F. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd. **J Clin Oral**. 1976; 86: 713-727.
- 125.SCHON R, OHNO K, KUDO M, MICHI K. Peri-implant tissue reaction in bone irradiated the fifth day after implantation in rabbits: histologic and histomorphometric
- 126.SHAPIRO SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr Opin Cell Biol**. 1998; 10: 602–608.
- 127.SHERNOFF AF, COLWELL JA, BINGHAM SF. Implants for type II diabetic patients: interim report. VA Implants in Diabetes Study Group. **Implant Dent**. 1994; 3:1 83-185.
- 128.SILVERSTEIN, L.H. & KURTZMAN, G.M. Oral hygiene and maintenance of dental implants. **Dent Today**. 2006; 25: 70–75.
- 129.SIMINELAKIS S, KOTSANTI A, KOLAITIS N, NIOKOU D, VLACHOU I, DIMAKOPOULOS G, PAPDOPOULOU C. Circulating matrix metalloproteinase 3 due to myocardial ischemia. **Heart Surg Forum**. 2009; 12: E230-234.
- 130.SMITH DE, ZARB GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. **J Prosthet Dent**. 1989; 62: 567-572.
- 131.SOOKOIAN S, GARCIA S, GIANOTTI TF, DIEUZEIDE G, GONZALEZ CD, PIROLA CJ, The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- α gene is

associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. **AJH**. 2005; 18: 1271-1275.

132.SORSA T, TJÄDERHANE L, KONTTINEN YT. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. **Ann Med**. 2006; 38:306-321.

133.SORSA T, TJÄDERHANE L, T SALO. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Diseases**. 2004; 10 : 311-318.

134.SOUZA AP, TREVILATTO PC, SCARELL-CAMINAGA RM, BRITO JR. RB, LINE SRP. MMP1 Promoter Polymorphism: Association With Chronic Periodontitis Severity In A Brazilian Population. **J Clin Periodontol**. 2003; 30: 154-158.

135.SPIEKERMANN H, DONATH K, HASSEL T M, JOVANOVIC S, RITCHER E- J. Implantology – **Color Atlas of dental Medicine**. ed. New York: Georg Thime Verlag, Stuttgart, Thieme Medical Publishers, Inc, 1995. 3880.

136.SRIVASTAVA P, MANDHANI A, KAPOOR R, & MITTAL RD. Role of MMP-3 and MMP-9 and their haplotypes in risk of bladder câncer in North indian cohort. **Ann Surg Oncol**. 2010; 10:1153-1156.

137.STANFORD CM. Toward an understanding of implant occlusion and strain adaptive bone modeling and remodeling. **J Prosthetic Dentistry**. 1999;81: 553-561.

138.STRICKLIN GP, JEFFREY JJ, ROSWIT WT, EISEN AZ. Human skin fibroblast procollagenase: mechanisms of activation by organomercurials and trypsin. **Biochemistry**. 1983; 22: 61-68.

139.STRIETZEL, F.P., REICHARDT, P.A., KALE, A., KULKARNI, M., WEGER, B. & KUHLER, I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol**. 2007; 34: 523–544.



140. TERONEN O, KONTTINEN YT, LINDQVIST C, SALO T, INGMAN T, LAUHIO A, DING Y, SANTAVIRTA S, SORSA T. Human neutrophil collagenase MMP-8 in peri-implant sulcus fluid and its inhibition by clodronate. *J Dent Res.* 1997; 76: 1529-1537.
141. TERVAHARTIALA T, PIRILÄ E, CEPONIS A, MAISI P, SALO T, TUTER G, KALLIO P, TÖRNWALL J, SRINIVAS R, KONTTINEN YT, SORSA T. The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 2000; 79:1969-1977.
142. THOMPSON MW; MCINNES RR; WILLARD HF; THOMPSON & THOMPSON: **Genetics in Medicine**. 5. ed. Pensilvania: Philadelphia, 1991. 500.
143. TONETTI MS. Risk factors for osseodisintegration. *Periodontol.* 2000; 17: 55-62.
144. TREVILATTO PC; LINE SR. Use of buccal epithelial cells for per amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol.* 2000; 18: 6-9.
145. UCHIDA M, SHIMA M, SHIMOAKA T, FUJIEDA A, OBARA K, SUZUKI H, NAGAI Y, IKEDA T, YAMATO H, KAWAGUCHI H. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 2000; 185: 207-214.
146. VAIRAKTARIS E, YAPIJAKIS C, VASILIOU S. Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27: 4095-4100.
147. VAN WART He, BIRKEDAL-HANSSSEN H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinases activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 5578-5582.

148. VIHINEN P, KOSKIVUO I, SYRJÄNEN K, TERVAHARTIALA T, SORSA T, PYRHÖNEN S. Serum matrix metalloproteinase-8 is associated with ulceration and vascular invasion of malignant melanoma. **Melanoma Res.** 2008; 18: 268-273.
149. WAASDORP JA, EVIAN CI, MANDRACCHIA M. Immediate Placement of Implants Into Infected Sites: A Systematic Review of the Literature. **J Periodontol.** 2010; 312: 573-3242.
150. WAHLGREN J, MAISI P, SORSA T, SUTINEN M, TERVAHARTIALA T, PIRILÄ E, TERONEN O, HIETANEN J, TJÄDERHANE L, SALO T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. **J Pathol.** 2001; 194: 217-224.
151. WANG H, PARRY S, MACONES G. Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). **Hum Mol Genet.** 2004; 13: 2659–2669.
152. WEYANT RJ & BURT BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. **J Dent Res.** 1993; 72: 2-8.
153. WOESSNER Jr JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.** 1991;8: 2145- 2154.
154. WU S, LU S, TAO H, ZHANG L, LIN W, SHANG H, XIE J. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.** 2011; 31(1): 114-119.
155. XU L, YU Z, LEE HM, WOLFFS MS, GOLUB LM, SORSA T, KUULA H. Characteristics of collagenase-2 from gingival crevicular fluid and peri-implant sulcular fluid in periodontitis and peri-implantitis patients: pilot study. **Acta Odontol Scand.** 2008; 66: 219-224.

156. Ye S Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. **Matrix Biol.** 2000; 19: 623–639.
157. YE S, ERIKSSON P, HAMSTEN A, KURKINEN M, HUMPHRIES SE, HENNEY AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. **J Biol Chem.** 1996; 271: 13055-13060.
158. YE S, PATODI N, WALKER-BONE K, READING I, COOPER C, DENNISON E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis. **Int J Immunogenet.** 2007; 34: 81-85.
159. Ye S, WATTS GF, MANDALIA S, HUMPHRIES SE, HENNEY AM. Genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. **Br. Heart J.** 1995; 73: 209-215.
160. YOON S, TROMP G, VONGPUNSAWAD S, RONKAINEN A, JUVONEN T, KUIVANIEMI H. Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms. **Biochem Biophys Res Commun.** 1999; 265: 563-568.
161. YUAN HY, TANG Y, LIANG YX, LEI L, XIAO GB, WANG S, XIA ZL. Matrix metalloproteinase-3 and vitamin d receptor genetic polymorphisms, and their interactions with occupational exposure in lumbar disc degeneration. **J Occup Health.** 2010; 52: 23-30.
162. ZHOU X, GAO Y, JOHNSON NW, GAO J. Immunoexpression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. **Australian Dental Journal.** 2010; 55: 385-389.

163.ZINZINDOHOUE F, LECOMTE T, FERRAZ JM. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. **Clin**

9. ANEXO 1: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 <p>UNICAMP</p>	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</p> <p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Associação entre polimorfismos gênicos e perda de implantes osseointegrados", sob o protocolo nº 006/2002, das Pesquisadoras Maria Cristina Leme Godoy dos Santos e Maria Isabela Guimarães Campos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, 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 – FOP.</p>	<p>Piracicaba, 16 de agosto de 2002</p>	<p>We certify that the research project with title "Association Between Genetic Polymorphisms and the of lose dental implants", protocol nº 006/2002, by Reseacher Maria Cristina Leme Godoy dos Santos and Maria Isabela Guimarães Campos responsibility by Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).</p>
<p><i>Fernanda Klein Marcondes</i> Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes</p> <p>Secretário em Exercício CEP/FOP/UNICAMP</p>	<p><i>Pedro Luiz Rosalen</i> Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen</p> <p>Coordenador em Exercício CEP/FOP/UNICAMP</p>	<p>Piracicaba, SP, Brazil, August 16 2002</p>