



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA IL-1 E
DO IL-1RA COM A PERI-IMPLANTITE – ESTUDO PILOTO**

Trabalho submetido por
Constança Maria Marques Cleto Jarmela Palos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA IL-1 E
DO IL-1RA COM A PERI-IMPLANTITE – ESTUDO PILOTO**

Trabalho submetido por
Constança Maria Marques Cleto Jarmela Palos
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Mestre José Maria Cardoso
Trabalho coorientado por
Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

outubro de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Mestre José Maria Cardoso, por ter aceitado orientar a minha tese, pela confiança e responsabilidade depositada em mim, pelas palavras de incentivo, pelo conhecimento que me transmitiu, por toda a disponibilidade, apoio, dedicação e ajuda prestada desde que iniciei este projeto.

À Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro, por ter aceitado ser minha coorientadora, pela boa disposição, pela partilha de conhecimentos e por toda a disponibilidade, ajuda e apoio demonstrados ao longo deste projeto.

Ao Prof. Doutor Luís Proença pela disponibilidade e ajuda crucial na análise estatística.

Aos meus pais, que são o meu pilar e a minha fonte de inspiração, por me terem tornado na pessoa que sou hoje em dia, pelos valores que me inculcaram e pela educação de excelência que me proporcionaram. Não posso deixar de referir todo o esforço, dedicação e apoio incondicional que me deram em todos os momentos ao longo destes anos. Nunca esquecerei que sempre acreditaram em mim desde o primeiro dia e sempre fizeram os possíveis e impossíveis para que eu pudesse ter um futuro promissor. Ao meu irmão, por ser o meu pilar, por me ter acompanhado em todas as conquistas e derrotas, pelos momentos partilhados juntos, por acreditar sempre em mim e por estar sempre presente.

À minha família, por todo o apoio incondicional e por também terem sido fundamentais na minha educação e crescimento.

Às minhas colegas de box, Marta e Sara, por todos os momentos vividos e partilhados, pela amizade, confiança, empatia, pelas memórias felizes, as quais levarei para o resto da vida.

A todos os meus amigos, que sempre me apoiaram e me acompanharam ao longo destes anos e que me enriquecem pessoalmente. Sem eles esta caminhada não teria sido a mesma.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, que se tornou na minha segunda casa durante os últimos 5 anos e a todas as pessoas que o constituem, por me terem recebido de braços abertos, por tudo aquilo que me foi ensinado, pelo ensino de excelência e espírito de compromisso que têm com os seus alunos. Tenho um orgulho enorme em fazer parte desta *muy noble* academia.

*“Aprender é importante, mas mais importante é aprender a aprender e desejar
continuar a aprender.”*

(Padre Pedro Arrupe)

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no oceano.
Mas o oceano seria menor se lhe faltasse uma gota”*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Objetivos: Avaliar a possível associação dos polimorfismos genéticos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴, IL-1RN (inirão 2) e o desenvolvimento de peri-implantite, através de um estudo piloto efetuado numa população de pacientes caucasianos da Clínica Dentária Egas Moniz.

Materiais e Métodos: Foram selecionados 20 pacientes, 10 com saúde peri-implantar e 10 com peri-implantite. As amostras contendo células da mucosa jugal foram armazenadas a -20°C e posteriormente submetidas ao processo de extração de DNA. A análise genética foi realizada através da técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*), RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e através de análise eletroforética. A análise estatística foi realizada através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Resultados e Discussão: Para o gene da IL-1A⁻⁸⁸⁹, observou-se que o alelo mutado foi observado em maior percentagem no grupo peri-implantite comparativamente ao grupo controlo (30% vs 15% respetivamente). Para o gene IL-1B⁺³⁹⁵⁴, observou-se também que o alelo alterado estava presente em maior percentagem no grupo doença comparativamente ao grupo controlo (35% vs 10% respetivamente). O genótipo positivo (presença de pelo menos um alelo T em ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴), foi detetado em 6 pacientes, sendo que 5 pertenciam ao grupo doença e 1 ao grupo saúde. Para o IL-1RN observou-se a presença do alelo 1 em todos os pacientes, à exceção de um paciente pertencente ao grupo saúde, que apresentava o alelo 1 (VNTR de 412pb) e o alelo 3 (VNTR de 326 pb). Não se observou uma diferença estatisticamente significativa quanto à presença dos polimorfismos nos genes da IL-1 e do IL-1RN entre os grupos.

Conclusão: Para o polimorfismo do gene IL-1RN não se verificaram diferenças entre os grupos. Relativamente aos polimorfismos dos genes da IL-1 não se observou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo saúde e doença, contudo uma tendência deve ser realçada mostrando uma potencial ligação do genótipo da IL-1 e a peri-implantite.

Palavras-chave: DNA; IL-1; Peri-implantite; Polimorfismos.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the possible association of genetic polymorphisms IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴, IL-1RN (Intron 2) and the development of peri-implantitis, through a pilot study carried out in a population of Caucasian patients from the Egas Moniz Dental Clinic.

Materials and Methods: 20 patients were selected, 10 with peri-implant health and 10 with peri-implantitis. Samples containing cells from the buccal mucosa were stored at -20°C and later submitted to the DNA extraction process. Genetic analysis was performed using the PCR (Polymerase chain reaction), RFLP (Restriction fragment length polymorphism) and electrophoretic analysis. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences program (SPSS).

Results and Discussion: For the IL-1A⁻⁸⁸⁹ gene, it was observed that the mutated allele was observed in a higher percentage in the peri-implantitis group compared to the control group (30% vs 15% respectively). For the IL-1B⁺³⁹⁵⁴ gene, it was also observed that the altered allele was present in a higher percentage in the disease group compared to the control group (35% vs 10% respectively). The positive genotype was detected in 6 patients, 5 belonging to the disease group and 1 to the health group. For IL-1RN, the presence of allele 1 was observed in all patients, except for one patient belonging to the health group, which had allele 1 and allele 3. There was no statistically significant difference in the presence of polymorphisms in the IL-1 and IL-1RN genes between the groups.

Conclusion: For the IL-1RN gene polymorphism there were no differences between groups. Regarding IL-1 gene polymorphisms, there was no statistically significant difference between the health and disease group, however a trend should be highlighted, showing a potential link between the IL-1 genotype and peri-implantitis.

Keywords: DNA; IL-1; Peri-implantitis ; Polymorphisms.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	15
1. Peri-implantite.....	15
1.1. Definição de Peri-implantite	15
1.2. Características clínicas e histopatológicas.....	15
1.3. Etiologia da Peri-implantite.....	18
1.4. Fatores/indicadores de risco	19
1.5. Prevalência da Peri-implantite	20
2. Marcadores inflamatórios na Peri-implantite.....	22
2.1. Interleucina-1 (IL-1).....	22
2.2. Antagonista do recetor da IL-1	23
3. Polimorfismos genéticos	23
3.1. Definição de polimorfismo	23
3.2. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP).....	25
3.3. <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR).....	25
4. Associação dos polimorfismos genéticos e a Peri-implantite	26
5. Técnicas laboratoriais para a análise dos polimorfismos.....	29
5.1. Técnica de <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	29
5.2 Técnica de <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	31
II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO	33
III. MATERIAIS E MÉTODOS	35
1. Considerações Éticas	35
2. Caracterização do estudo	35
3. Seleção da amostra.....	35
4. Critérios de inclusão	36
5. Critérios de exclusão.....	37

6. Local de Realização do Estudo	37
7. Colheita de material genético.....	37
8. Extração de DNA	38
9. Técnica de <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	43
10. Análise do polimorfismo <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (VNTR)	46
11. Análise do <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	47
12. Análise estatística	50
IV. RESULTADOS.....	51
1. Análise das técnicas de PCR e PCR-RFLP.....	51
2. Frequências alélicas	56
3. Frequências genotípicas.....	59
4. Caracterização da amostra de acordo com a presença de genótipo positivo ..	62
V. DISCUSSÃO.....	65
VI. CONCLUSÃO	71
VII. BIBLIOGRAFIA.....	73
VIII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Colheita de material genético da mucosa jugal com o auxílio de um omniswab (Whatman FTA).	37
Figura 2: Amostras recolhidas armazenadas no frio a -20°C	38
Figura 3: Solução de Proteinase K	39
Figura 4: <i>Buffer</i> ATL	39
Figura 5: Incubadora de calor	39
Figura 6: <i>Buffer</i> AL	39
Figura 7: Amostras colocadas dentro da centrifugadora	40
Figura 8: Vórtex	40
Figura 9: QIAamp Mini Spin Column	40
Figura 10: <i>Buffer</i> AW1	41
Figura 11: <i>Buffer</i> AW2	41
Figura 12: Etanol Absoluto	42
Figura 13: <i>Buffer</i> ATE	42
Figura 14: Tubos “eppendorf” contendo o produto final da extração de DNA, fechados com Parafilm®M.	43
Figura 15: <i>Primers</i> IL1RN_F e IL1RN_R, respetivamente	44
Figura 16: Aliquotagem dos <i>primers</i> IL1RN_F e IL1RN_R respetivamente	44
Figura 17: Suporte com tubos eppendorf numerados	44
Figura 18: Microtubo “eppendorf” com volume final de 25 µl	44
Figura 19: <i>Primers</i> IL1A_F e IL1A_R	45
Figura 20: Aliquotagem dos <i>primers</i> IL1A_F e IL1A_R	45
Figura 21: <i>Primers</i> IL1B_F e IL1B_R	45
Figura 22: Aliquotagem dos <i>primers</i> IL1B_F e IL1B_R	45
Figura 23: Amostras dos genes IL-1A e IL-1B após técnica de PCR	46
Figura 24: SEaKem® LE Agarose	47
Figura 25: Corante <i>red-safe</i>	47
Figura 26: Enzima de restrição NcoI	48
Figura 27: NEBuffer™ r.3.1	48
Figura 28: Enzima de restrição TaqI	49
Figura 29: CutSmart®Buffer	49

Figura 30: Gel de agarose a 3%, com os resultados para o gene IL-1RN (intrão 2-VNTR). MPM: Marcador de peso molecular, NZYDNA ladder VI; CN: controlo negativo; Grupo de controlo: pacientes nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; Grupo teste: pacientes nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.	51
Figura 31: Perfil de restrição do fragmento do gene da IL-1A ⁻⁸⁹⁹ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%, (a) desde a amostra nº1 até à amostra nº10 e (b) desde a amostra nº 11 até à amostra nº26. MPM 1: Marcador de peso molecular, NZYDNA ladder VI; MPM 2: Marcador de peso molecular, pUC19/MspI (HpaII) Marker; X: poço sem amostra; Os números acima dos poços correspondem ao código designado a cada paciente; grupo controlo nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; grupo teste: nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.	53
Figura 32: Repetição da restrição do fragmento do gene da IL-1A ⁻⁸⁹⁹ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%, para as amostras 1, 2, 6, 11, 16, 20, 21, 24 e 26. MPM 3: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.	54
Figura 33: Perfil de restrição do fragmento do gene da IL-1B ⁺³⁵⁹⁴ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%. MPM 3: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder. Os números acima dos poços correspondem ao código designado a cada paciente; grupo controlo nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; grupo teste: nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos graus de severidade da peri-implantite. Adaptado de (Froum & Rosen, 2012).....	16
Tabela 2: Tabela com os critérios clínicos para saúde e doença nos tecidos peri-implantares com base no workshop mundial de 2017 sobre a classificação das doenças periodontais e peri-implantares. Adaptado de (Aldahlawi, 2018).....	17
Tabela 3: Genes da IL-1A, IL-1B, IL-1RN, polimorfismos e produtos dos genes. Adaptado de (Greenstein & Hart, 2002).....	29
Tabela 4: Sequência dos <i>primers</i> escolhidos para cada um dos polimorfismos genéticos em estudo. Adaptado de (Kornman, 1997).....	46
Tabela 5: Relação das endonucleases de restrição, temperatura e fragmentos esperados Adaptado de (Kornman, 1997).	49
Tabela 6: Perfis de restrição das endonucleases.....	49
Tabela 7: Frequências alélicas dos polimorfismos da IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), no grupo saúde peri-implantar e no grupo peri-implantite.	57
Tabela 8: Frequências genotípicas nos polimorfismos da IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), no grupo saúde peri-implantar e no grupo peri-implantite.	59
Tabela 9: Genótipos positivos presentes na amostra.....	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Frequência alélica do polimorfismo do gene IL-1RN.....	52
Gráfico 2: Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo do gene da IL-1A, no total da amostra	55
Gráfico 3: Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo do gene da IL-1B, no total da amostra	56
Gráfico 4: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1RN, em ambos os grupos.	57
Gráfico 5: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1A, em ambos os grupos.	58
Gráfico 6: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1B, em ambos os grupos.	59
Gráfico 7: Frequência genotípica do polimorfismo do gene da IL-1RN (intrão 2) VNTR, para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite	60
Gráfico 8: Frequência genotípica do polimorfismo IL-1A ⁻⁸⁸⁹ , para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite	61
Gráfico 9: Frequência genotípica do polimorfismo IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ , para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite	62
Gráfico 10: Distribuição do genótipo positivo entre o grupo saúde peri-implantar e o doença ($p>0,05$).....	63

LISTA DE SIGLAS

μl: Microlitro

μM: Micromolar

AL: Tampão de lise

ATE: Tampão de eluição

ATL: Tampão de lise celular

AW: Tampão de lavagem

C: Citosina

CD: *Cluster of differentiation*

CNV: *Copy Number variation*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

IG: Índice gengival

IL: Interleucina

IL-1Ra: Antagonista do recetor da IL-1

IP: Índice de placa

LES: Lúpus eritematoso sistémico

LPS: Lipopolissacarído

MPM: Marcador de peso molecular

PA: Ativador de plasmonogénio

PICF: Fluido crevicular peri-implantar

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase chain reaction*

PGE2: Prostaglandinas E2

PI: Peri-implantite

PS: Profundidade de sondagem

mA: Miliampere

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MMPs: Metaloproteinases de matriz

NIP: Nível de inserção periodontal

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: Ácido ribonucleico

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

STR: Microssatélites de repetições curtas tandem

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

T: Timina

TAE: Tris acetato EDTA

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UTR: *Untranslated region*

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats

I. INTRODUÇÃO

1. Peri-implantite

1.1. Definição de Peri-implantite

A peri-implantite é caracterizada por ser uma doença complexa e progressiva, que ocorre a nível dos tecidos duros e moles que se encontram em redor dos implantes dentários osteointegrados em função. Trata-se de uma condição patológica definida pela presença de inflamação da mucosa peri-implantar, acompanhada por um processo inflamatório destrutivo a nível dos tecidos moles e subsequente perda progressiva do osso de suporte, detetada radiograficamente (Berglundh et al., 2018; Schwarz et al., 2018; Smeets et al., 2014; Wilson, 2013). A presença de alterações inflamatórias a nível dos tecidos que circundam os implantes e as modificações a nível da crista óssea, devem-se à acumulação microbiana e/ou fatores iatrogénicos (Berglundh et al., 2018).

1.2. Características clínicas e histopatológicas

Relativamente às características clínicas e, de acordo com Berglundh et al. (2018), as zonas que apresentam peri-implantite, são caracterizadas pela presença de sinais clínicos de inflamação, hemorragia e/ou supuração à sondagem, bem como aumento da profundidade de sondagem e/ou recessão da margem gengival, juntamente com a evolução da perda óssea radiográfica quando comparada com exames anteriores.

É importante salientar que esta taxa de progressão pode variar entre pacientes. Além disso, em locais que apresentam doença peri-implantar, a profundidade de sondagem constitui um indicador de severidade da mesma, uma vez que se encontra relacionada com a perda óssea (Berglundh et al., 2018).

Tabela 1: Classificação dos graus de severidade da peri-implantite. Adaptado de (Froum & Rosen, 2012).

Leve	Profundidade de sondagem ≥ 4 mm (hemorragia e/ou supuração na sondagem) Perda óssea de $<25\%$ do comprimento do implante
Moderada	Profundidade de sondagem ≥ 6 mm (hemorragia e/ou supuração na sondagem) Perda óssea de $25\%-50\%$ do comprimento do implante
Severa	Profundidade de sondagem de ≥ 8 mm (hemorragia e/ou supuração na sondagem) Perda óssea de $> 50\%$ do comprimento do implante

Quando não existem registos de exames anteriores de doença peri-implantar, o diagnóstico da peri-implantite deve ser realizado através da combinação de 3 critérios distintos: presença de hemorragia e/ou supuração na realização de uma sondagem suave; presença de uma profundidade de sondagem com valores maiores ou iguais a 6 mm; presença de níveis ósseos com medições maiores ou iguais a 3 mm para apical desde a porção mais coronal da parte intraóssea do implante, ou seja, existência de uma perda óssea que vá para além do processo de remodelação óssea inicial (Berglundh et al., 2018).

A sondagem peri-implantar, sob condições apropriadas de pressão, com valor de 0.25N, não danifica o tecido mole e apresenta um papel fundamental para que seja possível estabelecer-se um diagnóstico correto (Heitz-Mayfield, 2008; Renvert et al., 2018).

A nível das características histológicas, as lesões de peri-implantite são caracterizadas por conterem um elevado número e densidade de células plasmáticas, neutrófilos e macrófagos e estendem-se apicalmente ao epitélio juncional (Berglundh et al., 2018). Desta forma, histologicamente, as zonas de peri-implantite, normalmente apresentam lesões inflamatórias maiores quando comparado com locais de periodontite (Schwarz et al., 2018).

Ao contrário dos tecidos periodontais, os tecidos peri-implantares não possuem cemento radicular nem ligamento periodontal. A nível do tecido conjuntivo não se verifica a presença de fibras aderidas à superfície do implante. Além disso, o epitélio peri-implantar é frequentemente mais longo, comparativamente ao dos tecidos periodontais

(Berglundh et al., 2018). Desta forma, devido à ausência de ligamento periodontal e à presença de um número reduzido de fibroblastos e vasos sanguíneos, os mecanismos de defesa dos tecidos peri-implantares vão ser menores, comparativamente aos dos tecidos periodontais (Berglundh et al., 2007; Henriques et al., 2016; Lang & Berglundh, 2011).

No que concerne à irrigação, quando comparados à zona de tecido conjuntivo dos tecidos periodontais, verifica-se que os tecidos peri-implantares, na região localizada entre o epitélio funcional e a crista óssea, são menos vascularizados (Berglundh et al., 2018).

Tabela 2: Tabela com os critérios clínicos para saúde e doença nos tecidos peri-implantares com base no workshop mundial de 2017 sobre a classificação das doenças periodontais e peri-implantares. Adaptado de (Aldahlawi, 2018).

	Saúde Peri-implantar	Mucosite Peri-implantar	Peri-implantite
Tecido mole	Ausência de inflamação; Rosado, tecido firme e sem edema	Sinais de inflamação: Edema localizado, eritema e tecido mole friável Sensibilidade localizada à área envolvida	Sinais de inflamação dos tecidos peri-implantares: Edema, eritema e tecido mole friável
Hemorragia à sondagem	-	++	++
Supuração	-	+	+
Profundidade de Sondagem	Profundidade de sondagem estável, similar à medição inicial	Pode estar aumentada devido à condição do tecido mole	Aumento da profundidade de sondagem em comparação aos valores iniciais

			OU Na ausência de valores de PS iniciais a PS $\geq$ 6mm
Perda óssea radiográfica	Ausência de perda óssea após a remodelação inicial (< 2 mm)	Ausência de perda óssea após a remodelação inicial (< 2 mm)	Perda óssea progressiva, comparado com o valor ósseo inicial radiográfico OU Na ausência de imagem óssea radiográfica prévia: Nível ósseo $\geq$ 3 mm para apical à porção coronal da zona intraóssea do implante

1.3. Etiologia da Peri-implantite

A etiologia da peri-implantite é multifatorial, não havendo apenas um, mas sim vários fatores responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento da doença (Petkovic-Curcin et al., 2017). Fatores como a colonização bacteriana, a resposta inflamatória e a resposta imunitária do hospedeiro têm sido indicados como sendo os fatores etiológicos que mais contribuem para o desenvolvimento da peri-implantite (Berglundh et al., 2018).

Na literatura, é amplamente descrito o papel da colonização bacteriana no desenvolvimento da peri-implantite, enquanto fator necessário, mas não suficiente, para a evolução desta patologia (Petkovic-Curcin et al., 2017).

Estudos revelam que pacientes que apresentem um deficiente controlo de placa bacteriana, isto é, baixo nível de higiene oral e que não se apresentem de forma regular às consultas de controlo implantar, apresentam um maior risco para o desenvolvimento desta doença (Berglundh et al., 2018).

No que diz respeito ao perfil bacteriano associado à peri-implantite, este é complexo, altamente variável e heterogêneo (Petkovic-Curcin et al., 2017; Renvert & Quirynen, 2015). Mombelli e Dècaillet (2011), concluíram que a peri-implantite pode ser vista como uma infeção anaeróbia polimicrobiota, uma vez que na maioria dos casos é dominada por diversas bactérias anaeróbias Gram negativas (-). As bactérias associadas à periodontite são comumente encontradas na peri-implantite, no entanto, comparando ambas as doenças, na peri-implantite podemos encontrar concentrações mais elevadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella. Forsythia*, *Treponema Denticola* (membros do complexo vermelho), *Prevotella intermedia* (membro do complexo laranja) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Alassy et al., 2019; Heitz-Mayfield & Lang, 2010; Hultin et al., 2002; Socransky et al., 1998). Porém, existem outras bactérias, como é o caso da *Staphylococcus aureus*, a qual evidencia um papel importante no desenvolvimento da PI, tendo sido encontrada em grandes concentrações na mesma, demonstrando grande afinidade para o titânio, não estando, no entanto, associadas à patologia periodontal (Persson & Renvert, 2014). Assim, embora o tipo da microflora que se encontra presente seja importante, a composição quantitativa da mesma tem um papel preponderante no desenvolvimento da peri-implantite (Rakic et al., 2016).

Estudos mais recentes indicam a possível influência da genética no desenvolvimento da peri-implantite (Petkovic-Curcin et al., 2017).

1.4. Fatores/indicadores de risco

Alguns indivíduos parecem ser mais propensos ao desenvolvimento de peri-implantite que outros. A suscetibilidade específica de um indivíduo pode aumentar o risco de desenvolvimento desta doença e, em última análise, levar à perda do implante dentário (Renvert & Quirynen, 2015).

Segundo Maney et al. (2020) e Dreyer et al. (2018), evidências recentes sugerem que existem fatores/indicadores de risco que se encontram associados ao desenvolvimento da peri-implantite, como é o caso da história prévia de periodontite, hábitos tabágicos, deficiente controlo de placa bacteriana característico de uma má higiene oral, ausência de terapia de manutenção regular, doenças sistémicas como a diabetes mellitus não controlada, a má qualidade do tecido mole peri-implantar e falta de gengiva queratinizada.

Encontram-se na literatura outros estudos que sugerem que fatores como a idade, o género, a vitamina D e a presença de doenças autoimunes também desempenham um papel no desenvolvimento da peri-implantite, contudo mais estudos são necessários para perceber o seu real efeito (Maney et al., 2020).

No que diz respeito à vertente genética, a sua influência no desenvolvimento da peri-implantite ainda não está bem clara, não existindo até à data, investigações que contenham uma dimensão de amostra considerável, nem estudos clínicos prospetivos suficientes (Maney et al., 2020; Schwarz et al., 2018). Por este motivo, a relação da genética com a peri-implantite, é vista como uma área de pesquisa futura (Schwarz et al., 2018). No entanto, com base nos estudos já existentes, os mesmos mostram que determinados polimorfismos podem estar associados à peri-implantite, evidenciando uma potencial associação dos mesmos com a patogénese desta doença (Maney et al., 2020; Schwarz et al., 2018).

Por outro lado, fatores de risco protéticos, como é o caso de um desenho restaurador impróprio, sobrecarga oclusal, *microgap* e causas iatrogénicas como cimento residual e o seu extravasamento, o qual pode desencadear um processo inflamatório, são também aspetos que aumentam o risco de peri-implantite (Maney et al., 2020).

1.5. Prevalência da Peri-implantite

A peri-implantite é um achado frequente, no entanto as estimativas da sua prevalência variam de forma bastante ampla entre os estudos (Shimchuk et al., 2020).

Os dados de prevalência da peri-implantite não são consensuais, em parte porque, os critérios de definição para o que é verdadeiramente considerado como peri-implantite, não são referidos da mesma forma nos diferentes estudos. Este facto verifica-se, devido à inconsistência nos critérios usados para diagnosticar a doença (Tomasi & Derks, 2012).

Além disso, uso de participantes *versus* implantes como unidade estatística de análise, permanece uma questão de considerável impacto, limitando as comparações de dados entre as revisões sistemáticas (Shimchuk et al., 2020). Quem sofre da doença peri-implantar é o doente e não o implante de forma independente, pelo que, a unidade para reportar a prevalência da mesma, deve ser o paciente e não implante em si. No entanto, em vários estudos a taxa de prevalência é analisada com base no implante e não no próprio indivíduo, o que constitui outra das principais razões para a controvérsia da prevalência desta doença. Os implantes que são colocados no mesmo doente dependem de fatores comuns como a ecologia oral, fatores genéticos, sistema imunológico, higiene, tabaco e supraestrutura protética, não devendo por isso, ser considerados independentes uns dos outros. Deste modo, deve ter-se em conta que dados estatísticos recolhidos do mesmo paciente se encontram inflacionados e podem subestimar a verdadeira prevalência da condição (Koldslund et al., 2010). Por exemplo, num estudo realizado por Mir-Mari et al. (2012), a prevalência de peri-implantite nos pacientes foi de 16,3%, enquanto que medida com base nos implantes foi de 9,1%. Já num estudo feito por Rokn et al. (2017) a percentagem de peri-implantite observada foi de 20% nos pacientes e 8,8% nos implantes.

É igualmente importante realçar que existem grandes variações a nível da prevalência da doença peri-implantar entre indivíduos que não apresentam a doença (os considerados como “saudáveis”) e aqueles que apresentam vários fatores de risco de desenvolvimento da mesma. Os resultados obtidos serão influenciados conforme o tipo de amostras existente, sendo que existe uma maior probabilidade de se vir a obter taxas superiores de peri-implantite em pacientes que apresentem fatores de risco para a doença (Tomasi & Derks, 2012). Desta forma, a prevalência desta complexa doença, apresenta grandes variações, tendo também em conta a presença de diferentes perfis de risco na população (Smeets et al., 2014).

Com a subida do número de implantes colocados no decorrer dos anos, é esperado que exista um aumento em relação à prevalência e incidência de doenças peri-implantares (Derks et al., 2016).

2. Marcadores inflamatórios na Peri-implantite

2.1. Interleucina-1 (IL-1)

A IL-1 é uma citocina multifuncional com um papel central na patogénese de doenças crónicas caracterizadas por processos de reabsorção óssea como é o caso da periodontite e da peri-implantite, apresentando atividade em diversas vertentes, nomeadamente a nível da resposta imunitária, na inflamação, na hemóstase e na degradação tecidual (Andreiotelli et al., 2008; Graves & Cochran, 2003; Kornman, 2006; Tatakis, 1993).

A IL-1 regula diretamente a expressão de vários genes e a sua atividade biológica é um dos principais reguladores da inflamação (Dinarello, 2002).

A família das IL-1 é constituída por uma grande variedade de genes, contento pelo menos 11 genes (Liao et al., 2014). No entanto, existem três bem definidos e que regulam a sua produção, nomeadamente, IL-1A, IL-1B e IL-1RN (Nicklin et al., 1994).

O gene da IL-1A é responsável pela síntese da proteína IL-1 α , o gene IL-1B pela síntese de IL-1 β , enquanto que o gene da IL-1RN controla a síntese da proteína IL-1Ra (Andreiotelli et al., 2008; Greenstein & Hart, 2002). A interleucina-1 é sintetizada por diversas células, tais como macrófagos, linfócitos, monócitos, células vasculares, células cerebrais, células epiteliais e fibroblastos (Andreiotelli et al., 2008). A produção de citocinas IL-1 pró-inflamatórias, por macrófagos e monócitos, é estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram - (Laine et al., 2006).

A IL-1 α é considerada como um mediador da inflamação local e é maioritariamente produzida por queratinócitos do epitélio juncional ou que estejam presentes na bolsa. Em contrapartida, a IL-1 β é produzida e libertada predominantemente por fibroblastos e macrófagos que se encontram ativos e atua a nível extracelular (Dinarello, 2002). Aquando da presença de uma infeção peri-implantar, é produzida localmente, em conjunto com outros fatores de resposta imune local, de forma a regular as reações inflamatórias. A mesma também controla a atividade de degradação da matriz extracelular pelo sistema ativador do plasminogénio (sistema PA) durante a inflamação e cicatrização de feridas, bem como a produção de prostaglandina E2 (PGE2) (Ransjö et al., 1998; Yin et al., 2000). A plasmina, enzima ativa resultante do sistema ativador de plasminogénio, ativa a IL-1 β (Syrovets et al., 2001).

Diversos estudos relataram que, em tecidos periodontais doentes, os níveis de IL-1 estão aumentados, sendo considerados um determinante crítico do resultado da periodontite (Graves & Cochran, 2003).

A IL-1 tem variadas funções entre elas, a ativação das células T e B, capacidade de estimular o catabolismo do tecido conjuntivo bem como a reabsorção óssea, é ativadora da quimiotaxia de macrófagos e de leucócitos como os neutrófilos, facilitando a sua migração, e estimula a produção de outras citocinas, como é o caso do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Prostaglandinas E2 (PGE2) e Metaloproteinases de matriz (MMPs) (Andreiotelli et al., 2008; Dinarello, 1994). As metaloproteinases de matriz são enzimas que têm como função degradar a matriz extracelular (Grigoriadou et al., 2010). As PGE2 foram associadas à reabsorção óssea mediada por osteoclastos e encontram-se em concentrações elevadas em locais com periodontite e peri-implantite (Preshaw & Heasman, 2002).

2.2. Antagonista do recetor da IL-1

O antagonista do recetor da IL-1 (IL-1Ra) é uma citocina anti-inflamatória, a qual funciona como um inibidor competitivo das interleucinas-1, inibindo a sua bioatividade (Hu et al., 2006). Esta citocina apresenta a capacidade de se ligar ao mesmo recetor da IL-1 presente na superfície da célula hospedeira, bloqueando-o, inibindo consequentemente a transdução do sinal (Laine et al., 2006).

A IL-1Ra, é uma proteína codificada pelo gene IL-1RN e tem a única função conhecida de impedir a ativação das células alvo (Graves & Cochran, 2003; Laine et al., 2006). Com o seu papel anti-inflamatório, vai evitar a transmissão de sinais pró-inflamatórios e a prevenção da resposta imune (Petkovic-Curcin et al., 2017).

3. Polimorfismos genéticos

3.1. Definição de polimorfismo

Polimorfismo genético corresponde a uma diferença na sequência de DNA entre indivíduos, grupos ou população (Ismail & Essawi, 2012; Teama, 2018). O mesmo é

definido como uma variação numa sequência específica da molécula de DNA que ocorre com uma frequência de pelo menos 1% na população (Kinane & Hart, 2003).

Ao contrário das mutações, os polimorfismos genéticos são usualmente considerados variantes normais na população (Kinane et al., 2005). No entanto, alguns deles podem aumentar ou diminuir o risco de um indivíduo para um fenótipo de doença, devido a uma mudança dramática na sequência de nucleótidos (Grigoriadou et al., 2010). Um polimorfismo genético pode ter um impacto variável, nomeadamente, não se observar qualquer alteração a nível da função da proteína, resultar numa pequena mudança na função da mesma, originar uma alteração séria ou até, provocar a destruição da sua função (Kinane et al., 2005).

Os polimorfismos dos genes humanos podem estar presentes apenas em um ou em mais que um local. Podem ser encontrados a nível do promotor, a nível dos exões ou regiões codificadoras do gene, nos intrões também designados de sequências intervenientes do gene e ainda na 3'-*untranslated region* (3'-UTR) (Jaber et al., 2004). As alterações genéticas que se possam vir a verificar vão depender da localização onde ocorre o polimorfismo. Caso envolva a região promotora, a atividade transcricional pode ser afetada, podendo apresentar uma relevância funcional, expressa através de um possível impacto a nível do número de proteínas que são sintetizadas por um determinado gene (Kinane et al., 2005). Se o polimorfismo se verificar a nível dos exões, o mesmo pode provocar uma alteração silenciosa, afetar a expressão ou a função do gene. Por outro lado, se o polimorfismo envolver o intrão, pode desencadear defeitos a nível do processamento de pré-RNA a RNA mensageiro. Em relação ao 3'-*untranslated region*, a ocorrência de um polimorfismo nesta região pode afetar a expressão genética através de alterações provocadas a nível da semi-vida do RNA ou influenciando a tradução que ocorre nos ribossomas (Van Deventer, 2000).

Polimorfismos genéticos são um mecanismo, através do qual os indivíduos podem apresentar variações, podendo estar associados a um aumento da suscetibilidade a determinadas doenças (Montes et al., 2009). Podem encontrar-se sobre a forma de polimorfismos de base única (SNP), polimorfismos de inserção e deleção, variações *copy number* (CNV) e polimorfismos do tipo repetitivo em *tandem*, os quais se dividem em dois tipos: os minissatélites de *variable number of tandem repeats* (VNTR) e os microsatélites de *short tandem repeat* (STR) (Al-Koofee & Mubarak, 2020; Ismail & Essawi, 2012; Teama, 2018).

3.2. *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

Os SNPs são definidos como a substituição de um único nucleótido que ocorre em mais de 1% da população geral (Yousefi et al., 2018).

São o tipo polimorfismo mais comum no genoma humano, estando localizado num local específico do gene, envolvendo somente um nucleótido. Assim, o SNP corresponde à presença de dois alelos para os quais podem existir três genótipos entre os indivíduos da mesma população (Ismail & Essawi, 2012).

Estimam-se que haja cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano, ocorrendo uma vez a cada 300 nucleótidos. Devido à sua grande abundância e estabilidade, os polimorfismos de base única tornaram-se marcadores genéticos importantes no mapeamento de doenças humanas, na genética de populações e em estudos evolutivos (Brookes, 1999; Teama, 2018).

Os SNPs podem ser encontrados entre genes ou dentro do próprio gene. Quando estão presentes no interior de um gene, podem ocorrer quer nos exões (regiões codificantes de proteínas), quer nos intrões (regiões não codificantes) (Kinane et al., 2005).

Este tipo de polimorfismo pode ter um impacto forte adicional na doença, através da estimulação da função do gene em causa, no entanto, geralmente, não têm influência no estado de saúde geral do indivíduo (Al-Koofee & Mubarak, 2020).

Dentro das várias técnicas disponíveis para detetar SNPs, a maioria dos métodos, envolve a análise de padrões de digestão através da aplicação de enzimas de restrição, as quais reconhecem e cortam sequências específicas de DNA (Van Deventer, 2000).

3.3. *Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)*

Os números variáveis de repetições tandem (VNTR), também conhecidos como minissatélites, são um tipo de polimorfismo, em que uma sequência de nucleótidos (a partir de 10 nucleótidos) é repetida um número variável de vezes em tandem. Os minissatélites encontram-se espalhados por todo o DNA humano (Al-Koofee & Mubarak, 2020). Normalmente, o número de bases que são repetidas difere de indivíduo para indivíduo, pelo que, consequentemente, a sua extensão também será variável. O

polimorfismo VNTR pode ser amplificado com base da técnica de PCR e analisado através da técnica de eletroforese em gel (Smittipat et al., 2005).

4. Associação dos polimorfismos genéticos e a Peri-implantite

Os genes da IL-1A, IL-1B e o IL-1RN, foram descritos como capazes de regular a produção de Interleucina-1 (Nicklin et al., 1994). Estão localizados perto uns dos outros, no braço longo do cromossoma 2, mais concretamente na posição 2q13, sendo considerados potenciais candidatos a marcadores genéticos na peri-implantite, uma vez que as citocinas que os mesmos codificam, IL-1 e IL-1Ra, desempenham um papel crucial no desenvolvimento da resposta inflamatória (Greenstein & Hart, 2002).

A interleucina-1, é considerada um mediador importante de doenças crónicas inflamatórias, tais como a periodontite e a peri-implantite, a colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistémico (LES) e líquen escleroso (Dinarelli, 1994; Kornman, 1997).

Ao longo dos últimos anos, foi gerada a hipótese de que a gravidade e o carácter progressivo do processo de inflamação a nível oral pode ser modulado pelo *background* genético de um indivíduo, por meio da expressão de citocinas e dos respetivos moduladores (Kornman, 1997).

O equilíbrio existente entre as proteínas IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra é alcançado devido à ligação competitiva que é estabelecida entre a citocina IL-1Ra e o recetor da IL-1. Desta forma, este equilíbrio é responsável pelo efeito das IL-1 a nível da resposta inflamatória (Liao et al., 2014).

A IL-1 α e a IL-1 β ativam o processo inflamatório sendo que, uma desregulação a nível da sua sinalização, provoca doenças inflamatórias manifestadas por inflamação aguda ou crónica grave (Brodzikowska et al., 2019; Di Paolo & Shayakhmetov, 2016).

Existem diversos estudos que indicam a presença de uma possível associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra com a presença de doenças peri-implantares, nas quais se incluem a peri-implantite, bem como a perda do implante (Liao et al., 2014).

O polimorfismo localizado na região -889, encontra-se na região promotora do gene da IL-1A e foi descrito como um polimorfismo bialélico, caracterizado pela troca da base azotada citosina (C) por uma base timina (T) (Mcdowell et al., 1995). O

polimorfismo localizado na posição +3954, situa-se no exão 5 do gene da IL-1B e caracteriza-se por esta mesma transição (C→T) (Pociot et al., 1992).

De acordo com o presente na literatura, em indivíduos que possuem o polimorfismo localizado na posição +3954 no gene IL-1B (presença do alelo 2), têm apresentado um aumento da produção de IL-1 β (Pociot et al., 1992). Foi sugerido recentemente que, o facto de alguns pacientes possuírem uma resposta mais vigorosa em relação a outros ao mesmo estímulo bacteriano, pode ser explicada pela presença deste polimorfismo (Greenstein & Hart, 2002).

Em doentes com peri-implantite, a presença do alelo 2 (alelo alterado) a nível da IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ pode atuar como um fator de risco para o aumento da destruição tecidual (Hamdy & Ebrahim, 2011).

O polimorfismo do gene da IL-1RN ocorre a nível do intrão 2, sendo caracterizado por números variáveis de repetições em tandem de 86pb (VNTR) (Tarlow et al., 1993). De acordo com Kornman, et al. (1997), neste polimorfismo podem ser encontrados cinco alelos diferentes, nomeadamente o alelo 1 de 412pb (4 repetições), alelo 2 de 240 pb (2 repetições), alelo 3 de 326 pb (3 repetições), alelo 4 de 498 pb (5 repetições) e alelo 5 de 584 pb (6 repetições).

Uma diminuição na produção da proteína IL-1Ra, tem vindo a ser associada com a presença do alelo 2 no gene da IL-1RN. Foi ainda demonstrado que existe uma maior produção *in vitro* de IL-1 β , por parte de células mononucleares portadoras do alelo 2 no gene da IL-1RN (Santtila et al., 1998).

Um aumento da suscetibilidade ou a possível ocorrência de um desenvolvimento mais exacerbado e severo de doenças inflamatórias, desencadeado pela presença de um desequilíbrio verificado a nível do rácio IL-1 β /IL-1Ra, foi considerado devido à possibilidade do alelo 2 do gene IL-1RN aumentar os níveis de IL-1 β (Laine et al., 2006).

Kornman et al. (1997) demonstraram pela primeira vez uma associação entre a presença do alelo 2 no gene da IL-1A na posição -889 e no gene da IL-1B na posição +3954 com o aumento do risco para desenvolver periodontite severa em pacientes caucasianos não fumadores. A presença desta combinação, IL-1A⁻⁸⁸⁹ (T) e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ (T), isto é, a existência de pelo menos um alelo 2 na posição -889 do gene da IL-1A e na posição +3954 do gene da IL-1B é designada de genótipo positivo.

Dentro dos estudos realizados sobre a associação entre os polimorfismos da IL1A⁻⁸⁸⁹ C/T e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T com o desenvolvimento da peri-implantite, os resultados obtidos têm sido controversos (Liao et al., 2014). Existem estudos que ao investigarem

esta relação não encontraram qualquer tipo de associação (Lachmann et al., 2007; Melo et al., 2011; Petkovic-Curcin et al., 2017). No entanto, foi descoberto que a presença do genótipo positivo em indivíduos fumadores pesados correspondeu a um aumento de perda óssea peri-implantar (Feloutzis et al., 2003; Gruica et al., 2004).

Lachmann et al. (2007), elaborou um estudo que teve como objetivo avaliar a possível associação do genótipo positivo com o volume do fluido crevicular em redor dos implantes (PICF) e com a presença de marcadores enzimáticos da resposta imune peri-implantar. Foi concluído que não houve associação entre os pacientes portadores de genótipo positivo e a presença de peri-implantite. Laine et al. (2006), realizaram um estudo que teve como principal objetivo verificar a possível existência de uma associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e a peri-implantite. Para tal foram incluídos 120 indivíduos caucasianos e os resultados obtidos demonstraram diferenças no que diz respeito à presença do alelo 2 no gene da IL-1RN entre pacientes portadores de peri-implantite (56,5%) e o grupo controlo (33,3%). Desta forma, os resultados do estudo fornecem evidência de que o polimorfismo do gene da IL-1RN está associado com a peri-implantite e que poderá representar um fator de risco para a mesma.

Um estudo realizado por Petkovic-Curcin et al. (2017), teve como objetivo investigar se determinados polimorfismos que codificam para o *cluster of differentiation* 14 (CD14), TNF- α , a IL-6, IL-10 e IL-1Ra estariam ou não associados com um maior risco de desenvolvimento de peri-implantite. Dentro dos polimorfismos avaliados, conclui-se apenas que o tabagismo e a presença dos genótipos TNF α -308 GA/AA podem aumentar o risco de peri-implantite, enquanto que, em contrapartida, os genótipos CD14-159 CT/TT diminuem este risco.

Um estudo mais atual desenvolvido por He et al. (2019), no qual foram selecionados 328 pacientes chineses não fumadores, teve como objetivo analisar se as variações genéticas que poderão regular as respostas inflamatórias apresentam alguma associação com o risco de peri-implantite. Desta forma, este estudo concluiu que indivíduos portadores do alelo T no polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T ou no polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵³⁴ C/T apresentam um risco significativamente maior de desenvolver peri-implantite e apresentam valores mais elevados de variáveis periodontais como a PS, IP, IG e NIP, demonstrando que tanto o polimorfismo genético IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T, como o polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T estão associados com um risco aumentado de peri-implantite e periodontite nesta população.

Numa revisão sistemática realizada por Formousis e Vlachos (2019), embora nenhuma conclusão robusta possa ser tirada da literatura atual, os autores concluíram que a identificação de biomarcadores genéticos associados ao risco de desenvolvimento de peri-implantite pode ser uma componente valiosa na prática clínica diária.

Até à data, existe um número limitado de estudos presentes na literatura que tiveram como objetivo avaliar esta associação. Dentro dos estudos já publicados, alguns deles não fazem referência a possíveis variáveis de confusão tais como a situação periodontal dos pacientes selecionados, a etnia dos mesmos e presença ou não de hábitos tabágicos. Desta forma, e perante as desigualdades encontradas entre estudos, torna-se necessário a realização de novos estudos que utilizem metodologias adequadas, bem como a sua realização em diferentes grupos étnicos (Fourmousis & Vlachos, 2019; Kinane et al., 2005; Rakic et al., 2016). O esclarecimento da base genética e identificação de biomarcadores que se encontrem associados à peri-implantite é extremamente importante, na medida em que podem ser usados para prever a ocorrência desta doença e para melhorar o tratamento da mesma. Além disso, também podem servir como um auxiliar na monitorização de pacientes que tenham implantes dentários (Alassy et al., 2019).

Tabela 3: Genes da IL-1A, IL-1B, IL-1RN, polimorfismos e produtos dos genes. Adaptado de (Greenstein & Hart, 2002).

Gene	Polimorfismo	Produto do gene
IL-1A	IL-1A ⁻⁸⁸⁹	IL-1 α
IL-1B	IL-1B ⁺³⁹⁵⁴	IL-1 β
IL-1RN	IL-1RN Intrão 2	IL-1Ra

5. Técnicas laboratoriais para a análise dos polimorfismos

5.1. Técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR)

A técnica de PCR permite amplificar fragmentos específicos de DNA, através de uma amostra pequena de material genético, mesmo quando a qualidade do próprio DNA

recolhido é relativamente baixa. É possível, através de material genético danificado, obter-se um novo nível de precisão e confiabilidade (Joshi & Deshpande, 2011). É considerada como uma técnica simples, que permite a amplificação de forma rápida de um fragmento de DNA ou um gene específico a partir de um molécula complexa de DNA, podendo obter-se um número ilimitado de cópias (Garibyan & Avashia, 2013).

Cada ensaio PCR requer a presença de DNA, nucleótidos, *primers* (que são pequenos fragmentos de DNA que apresentam uma sequência de nucleótidos complementar à sequência que está presente na molécula de DNA-alvo) e de DNA polimerase. Esta última consiste numa enzima chave que é capaz de unir os nucleótidos para dar origem ao produto de PCR. Cada um destes constituintes desempenha uma função específica e fundamental para que seja possível a realização da técnica de PCR. Por um lado, os nucleótidos vão funcionar como blocos de construção que a enzima DNA polimerase vai usar para que seja possível obter-se o produto de PCR. Por outro lado, de forma a ser possível especificar o produto que se pretende amplificar, os *primers*, vão servir como um ponto de extensão da enzima, através do qual a mesma poderá iniciar a formação de cópias (Garibyan & Avashia, 2013). Se estes três constituintes estiverem presentes (DNA modelo, *primers*, nucleótidos), a DNA polimerase irá proceder à construção de cópias exatas da molécula de DNA-alvo (Joshi & Deshpande, 2011).

Esta técnica é formada por 3 fases distintas: desnaturação, hibridação ou *annealing* e extensão. É constituída por diversos ciclos nos quais estas três etapas são repetidas pela mesma ordem para cada ciclo. Além disso, o número de cópias de material genético duplica por cada repetição destas três fases (Bermingham & Luetlich, 2003; Garibyan & Avashia, 2013).

No processo de desnaturação, que corresponde à primeira etapa da técnica, a solução contendo estes componentes é aquecida a uma temperatura de 94°C, temperatura que fica acima do ponto de fusão das duas cadeias complementares da molécula de DNA que se pretende amplificar, provocando a sua desnaturação e consequentemente separando-as em duas cadeias individuais. Na etapa da hibridação ou *annealing*, a temperatura encontra-se entre os 37-55°C. A sua diminuição, tem como objetivo permitir que os *primers* tenham a capacidade de se unirem aos fragmentos de DNA resultantes da primeira etapa. Esta união ocorre unicamente nos locais que apresentem sequências complementares. Na extensão, à semelhança da primeira etapa e contrariamente à fase anterior, a temperatura vai ser mais uma vez elevada. Esta última etapa é realizada a uma temperatura de 72°C e consequentemente a enzima DNA polimerase, através da adição

de nucleótidos à nova cadeia de DNA que se está a desenvolver, vai ter oportunidade de provocar a extensão dos *primers* (Garibyan & Avashia, 2013; Templeton, 1992).

A escolha da enzima de DNA polimerase é bastante importante para que haja uma boa performance da técnica de PCR. A Taq DNA polimerase é uma enzima termoestável recombinante, capaz de sintetizar DNA. Desde a sua descoberta, esta enzima tem sido melhorada ao longo do tempo, existindo hoje em dia, uma grande variedade comercial no mercado (Oliveira et al., 2015). A mesma pode suportar um aquecimento repetido com temperaturas de 94°C e por isso, mantém-se na amostra, sem ser necessário reforçar a sua quantidade devido a desnaturação (Bermingham & Luetlich, 2003; Joshi & Deshpande, 2011).

5.2 Técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism é baseada na técnica de digestão de DNA a partir de endonucleases de restrição. Trata-se de um método popular para a realização de genotipagens (Southern, 1975).

As enzimas de restrição usadas nesta técnica, normalmente reconhecem sequências de 4-6 pb e são designadas de endonucleases de restrição do tipo II. Têm como função reduzir uma cadeia de DNA em fragmentos de menor tamanho, ao apresentarem a capacidade de identificar e hidrolisar determinadas zonas da molécula de DNA (Brettschneider, 1998).

Numa análise PCR-RFLP, a primeira etapa consiste na amplificação do fragmento de DNA que contém a variação que se pretende estudar, a qual é seguida por uma segunda etapa em que o fragmento amplificado é tratado com uma enzima de restrição que seja apropriada para o que se pretende visualizar, através da adição da mesma à solução. Caso a enzima reconheça o local, vai hidrolisar o fragmento presente nessa mesma zona de reconhecimento, resultando na formação de novos fragmentos de restrição, que podem apresentar diferentes tamanhos. Posteriormente, para se proceder à sua identificação, é fundamental que o fragmento que se pretende analisar seja distinguido dos restantes que apresentem tamanhos semelhantes. Para tal, recorre-se à técnica de eletroforese em gel de agarose, uma vez que a mesma permite que ocorra uma separação com base no tamanho molecular (Berg, 2012).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO

O presente estudo tem como objetivo avaliar, através da realização de um estudo piloto, a possível relação entre a presença dos polimorfismos genéticos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴, IL-1RN (intron 2) e o desenvolvimento de peri-implantite numa população de pacientes caucasianos da Clínica Dentária Egas Moniz.

As hipóteses do estudo são:

- H0: Não se verifica uma associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra e o desenvolvimento da peri-implantite;
- H1: Verifica-se uma associação entre os polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra e o desenvolvimento da peri-implantite.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Considerações Éticas

A presente investigação obteve a aprovação da Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM) (Ver anexo 1).

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia (revista em 2013).

Foi distribuído e assinado, por todos os participantes deste estudo, um Termo de Consentimento Informado (Ver anexo 3), sendo os objetivos do estudo previamente explicados. Foram tomadas medidas apropriadas para a proteção dos dados do paciente, sendo atribuído a cada paciente um número.

Foram mantidos o anonimato e a confidencialidade dos dados, sendo que todas as amostras recolhidas foram descartadas após a sua análise e utilizadas exclusivamente para a realização deste estudo piloto.

2. Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo transversal controlado analítico – estudo Piloto. Quanto ao seu tipo, é uma investigação do tipo fundamental, de metodologia mista e com um desenho de estudo experimental baseado na análise de material genético recolhido de pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz, para posterior avaliação da possível relação entre a existência dos polimorfismos genéticos IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN com a peri-implantite.

3. Seleção da amostra

A amostra é constituída por 2 grupos. O primeiro grupo do estudo é formado por pacientes com peri-implantite diagnosticada (profundidade de sondagem igual ou superior a 6 mm, hemorragia e/ou supuração à sondagem, e perda óssea igual ou superior

a 3mm). O segundo, grupo controlo, é formado por pacientes que apresentam saúde peri-implantar (mucosa peri-implantar sem sinais inflamatórios e ausência de perda óssea peri-implantar). Esta seleção e distribuição dos pacientes foi feita de acordo com a nova classificação das Doenças Periodontais e peri-implantares (Berglundh et al., 2018).

Para esta investigação foram recrutados um total de 20 pacientes (n=20), 10 pacientes com saúde peri-implantar, os quais constituem o grupo controlo e 10 pacientes com peri-implantite diagnosticada, que correspondem ao grupo teste.

A seleção dos doentes foi feita com base nos critérios de inclusão do estudo. Para tal foi elaborado previamente um questionário, o qual foi aplicado a todos os pacientes, tanto do grupo controlo, como do grupo teste (Ver anexo 2). Procedeu-se à recolha de amostras de todos os doentes que se incluíam nos requisitos do estudo e assinassem o consentimento informado.

Cada paciente devia ter no mínimo um implante em boca, podendo apresentar mais que um implante. Não foi definida uma faixa etária específica, podendo participar no estudo pacientes de todas as idades, desde que portadores de implantes em função há pelo menos 1 ano. Também não foram definidos números limites entre sexos.

Todas as avaliações clínicas foram realizadas por dois operadores (orientador e orientanda) e como é habitual nas consultas de manutenção periodontal, cada um dos candidatos foi submetido a um exame de sondagem peri-implantar (6 localizações), avaliação do índice de placa e gengival (4 localizações), bem como da presença ou ausência de hemorragia à sondagem e/ou supuração. Previamente ao estudo foi feita uma calibração intra e inter-examinador. Nos casos em que se verificou uma profundidade de sondagem superior a 6 mm foi realizada uma radiografia de controlo do implante, através da técnica paralelométrica.

Todos os pacientes foram recrutados da consulta de periodontologia da Clínica Dentária Egas Moniz.

Foram excluídos 15 pacientes, por apresentarem um ou mais critérios de exclusão.

4. Critérios de inclusão

Como critérios de inclusão fazem parte os pacientes com pais e avós de origem caucasiana, que tenham implantes dentários colocados na Clínica Dentária do IUEM ou

numa clínica fora da faculdade, pacientes com peri-implantite diagnosticada, pacientes com implantes em função há pelo menos 1 ano, que aceitem participar no estudo e assinem o Consentimento Informado.

5. Critérios de exclusão

Relativamente aos critérios de exclusão os mesmos englobam pacientes que apresentem qualquer condição sistémica que afete o sistema imunológico, grávidas, pacientes com implantes não osteointegrados, reabilitações totais em ambos os maxilares, bem como aqueles que tenham sido submetidos a tratamento peri-implantar na zona a avaliar.

6. Local de Realização do Estudo

A colheita de material genético foi realizada na Clínica Dentária Egas Moniz no IUEM. A análise laboratorial foi feita no Laboratório de Biologia Molecular do IUEM.

7. Colheita de material genético

Foram recolhidas da mucosa jugal, com o auxílio de um omniswab (Whatman FTA), células da mucosa oral e colocadas dentro de tubos “eppendorf” de 2 ml, os quais foram inseridos em gelo (Figura 1).



Figura 1: Colheita de material genético da muscosa jugal com o auxílio de um omniswab (Whatman FTA).

Após a recolha das amostras, estas foram armazenadas no frio (-20°C) (Figura 2) e posteriormente submetidas ao processo de extração de DNA e análise genética através da técnica de PCR – RFLP (*polymerase chain reaction* seguida de *restriction fragment length polymorphism*) no laboratório de Biologia Molecular do IUEM. As amostras recolhidas foram utilizadas única e exclusivamente para este estudo e descartadas após a realização da análise em laboratório.



Figura 2: Amostras recolhidas armazenadas no frio a -20°C

8. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com base no “Protocol: Isolation of Total DNA from Surface and Buccal Swabs” retirado do QIAamp DNA Investigator Handbook.

Através do uso de micropipetas, foram adicionados 20 µl de proteinase K e 600 µl de *Buffer* ATL dentro dos tubos “eppendorf” de 2 ml que continham as omiswabs e de seguida colocou-se a solução no vórtex durante 10 segundos (Figura 3, 4 e 8). Posteriormente colocaram-se as amostras dentro de uma incubadora de calor, a uma temperatura de 56°C durante 1h, colocando-se no vórtex em simultâneo durante 10s de 10 em 10 min (Figura 5).

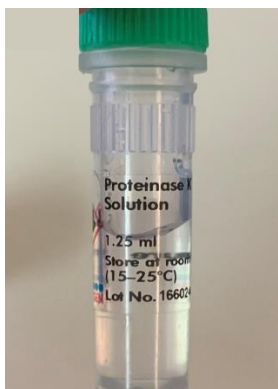


Figura 3: Solução de Proteinase K

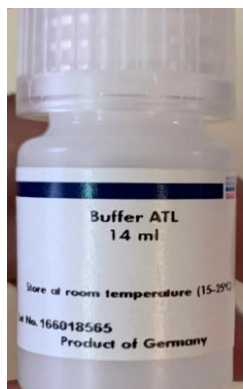


Figura 4: *Buffer* ATL



Figura 5: Incubadora de calor

Centrifugaram-se as amostras de forma a remover gotas do interior dos tubos “eppendorf” (Figura 7), adicionou-se 600 µl de *Buffer* AL (fornecido pelo fabricante) (Figura 6) e voltou-se a colocar as amostras no vórtex, durante 15 segundos. De forma a assegurar uma correta lise, é fundamental que a amostra e o tampão AL estejam completamente misturados de forma a produzir uma solução homogênea.

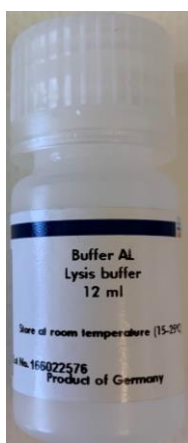


Figura 6: *Buffer* AL

De seguida, utilizou-se novamente a incubadora de calor, durante 10 min a uma temperatura de 70°C. A cada 3 min, os tubos foram colocados no vórtex durante 10 segundos de forma a facilitar a lise. Após nova centrifugação, adicionaram-se 300 µl de etanol (96%-100%), colocaram-se as amostras no vórtex durante 15 segundos, e posteriormente realizou-se uma nova centrifugação.

O *Buffer* ATL (tampão de lise celular) e AL (tampão de lise), são ambos tampões de lise, pelo que ao serem adicionados à amostra vão provocar a rutura da membrana celular. Desta forma, ao atuarem, vão-se obter moléculas de DNA e produtos lisados na amostra presente no interior de cada tubo “eppendorf”.



Figura 7: Amostras colocadas dentro da centrífugadora



Figura 8: Vórtex

Posteriormente, transferiu-se 700 μ l da solução obtida para o interior de uma coluna QIAamp MinElute (inserida num tubo coletor de 2 ml), sem tocar na membrana e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 min (Figura 9). Cuidadosamente, descartou-se o remanescente e voltou-se a juntar a coluna QIAamp MinElute ao tubo coletor de 2 ml. Repetiu-se este procedimento com o lisado remanescente presente nos tubos “eppendorf” de 2 ml, até não haver mais amostra. Após a última centrifugação descartou-se o tubo coletor de 2 ml e colocou-se a coluna QIAamp MinElute num novo tubo coletor de 2 ml. Neste procedimento, o DNA fica retido na membrana da coluna, enquanto os produtos lisados se acumulam na parte inferior do tubo coletor de 2 ml, sendo por isso descartados.



Figura 9: QIAamp Mini Spin Column

O *Buffer* AW1 e o *Buffer* AW2, funcionam como tampões de lavagem, pelo que a sequência dos restantes procedimentos vai servir para lavar a molécula de DNA, retirando os produtos lisados que ainda se encontram presentes na amostra (Figura 10 e 11).

Desta forma, e seguindo o protocolo, adicionou-se 500 µl de *Buffer* AW1 sem tocar na membrana e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 min. No fim da centrifugação, descartou-se novamente o tubo coletor de 2 ml contendo o remanescente obtido neste passo e colocou-se a coluna QIAamp MinElute dentro de um novo tubo coletor de 2 ml. De seguida, repetiu-se o mesmo procedimento realizado para o tampão AW1, mas adicionando-se 700 µl de AW2. O tampão AW2, tampão de lavagem 2, apresenta a mesma função que o AW1. O contacto entre a coluna QIAamp MinElute e o remanescente obtido presente no fundo do tubo coletor deve ser evitado, pelo que se deve ter cuidado na remoção destes do interior da centrifugadora, bem como quando se remove a coluna do interior do tubo para se descartar o produto lisado.

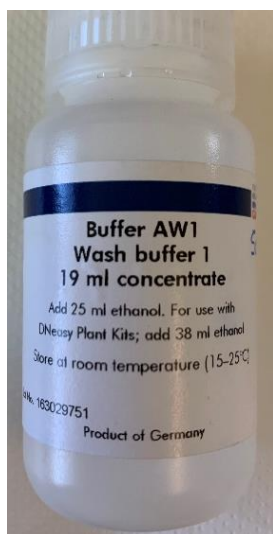


Figura 10: *Buffer* AW1



Figura 11: *Buffer* AW2

De seguida, foram adicionados 700 µl de etanol (96%-100%), centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 min, descartou-se o tubo coletor contendo solução resultante da centrifugação e colocou-se a coluna QIAamp MinElute num novo tubo coletor de 2 ml. Procedeu-se à centrifugação das amostras a 14,000 rpm durante 3 min de forma a secar completamente a membrana. O etanol tem como função precipitar o DNA que ficou retido na membrana (Figura 12).

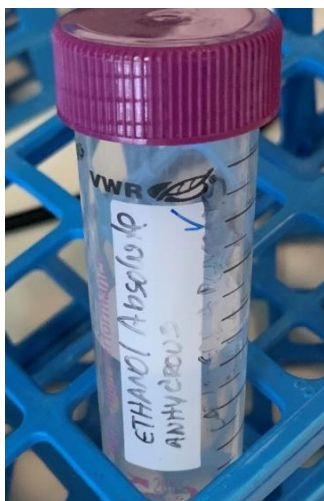


Figura 12: Etanol Absoluto

A coluna QIAamp MinElute foi transferida para um tubo de microcentrifugadora de 1.5 ml (“eppendorf”) novo e descartou-se o tubo coletor contendo a solução remanescente. Cuidadosamente abriu-se a tampa da coluna QIAamp MinElute e incubou-se a 56°C durante 3 min.

Por fim, adicionou-se, no centro da membrana da coluna, 25 µl de *Buffer ATE* em cada uma das amostras, fecharam-se as tampas dos tubos, procedeu-se à incubação dos mesmo a temperatura ambiente (15°-25°C) durante 1 min e de seguida centrifugou-se a 14,000 rpm durante 1 min. Voltou-se a repetir este último passo de forma a se obter um volume final de 50 µl em cada uma das amostras. A adição de ATE no centro da membrana é importante de forma a garantir uma eluição completa do DNA presente (Figura 13).



Figura 13: *Buffer ATE*

Os tubos “eppendorf” foram selados com Parafilm®M e armazenados novamente no frio (-20°C) (Figura 14).



Figura 14: Tubos “eppendorf” contendo o produto final da extração de DNA, fechados com Parafilm®M.

9. Técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR)

O DNA obtido foi amplificado através da técnica de PCR, sendo que foram utilizados iniciadores específicos para cada um dos genes que se pretendeu estudar. As sequências dos iniciadores sense (direto) e anti-sense (indireto), isto é, dos *primers forward* e *reverse* foram descritas por Kornman et al. (1997) (Tabela 4).

A preparação para PCR foi igual para todas as amostras, tendo-se realizado inicialmente a preparação das mesmas para a análise do polimorfismo do tipo VNTR do gene IL-1RN e de seguida para a análise dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ através da técnica de RFLP. As técnicas de PCR foram realizadas de acordo com o descrito por Kornman et al. (1997).

Para o polimorfismo do gene IL-RN, procedeu-se à aliquotagem dos *primers* numa concentração de 10 µM (Figura 15 e 16) e realizou-se a preparação de *Master Mix*. O mesmo foi preparado para ser usado num volume de 22 amostras (20 amostras de DNA, um controlo negativo e um volume extra para prevenir erros de volumes).



Figura 15: Primers IL1RN_F e IL1RN_R respetivamente

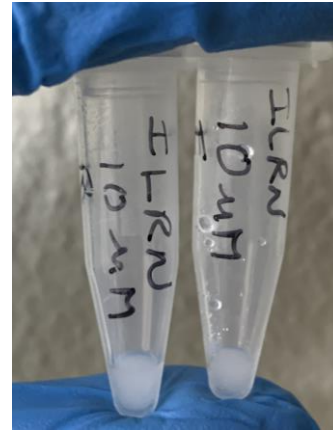


Figura 16: Aliquotagem dos primers IL1RN_F e IL1RN_R respetivamente

Para a preparação do *Master Mix*, em primeiro lugar adicionou-se a um tubo “eppendorf”, 121 μ l de RNase-free Water, seguido de 275 μ l de Mytaq (contém taq DNA Polimerase, dNTP's, $MgCl_2$, *Buffer*) e por fim 22 μ l de *primer forward* e 22 μ l de *primer reverse*, correspondente ao polimorfismo a analisar.

Foram numerados microtubos “eppendorf” de 0,5 ml para PCR, e transferidos para o interior dos mesmos 20 μ l do *Master Mix* preparado na etapa anterior. Posteriormente, adicionou-se 5 μ l de DNA de cada amostra, em cada tubo PCR “eppendorf” de 0,5 ml, obtendo-se um volume final de 25 μ l (Figura 17 e 18). Nos tubos de controlo negativo adicionou-se 5 μ l de RNase-free water, ao invés de DNA, para perfazer um volume total de 25 μ l.



Figura 17: Suporte com tubos eppendorf numerados

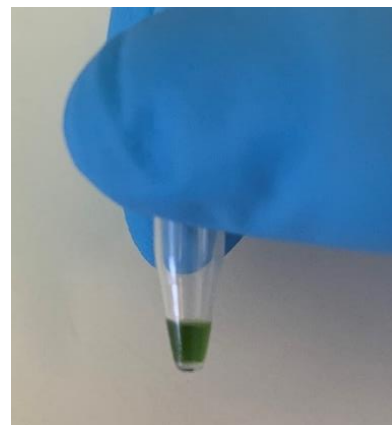


Figura 18: Microtubo “eppendorf” com volume final de 25 μ l

Repetiu-se este procedimento para a análise dos polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ (Figura 19, 20, 21 e 22).



Figura 19: Primers IL1A_F e IL1A_R

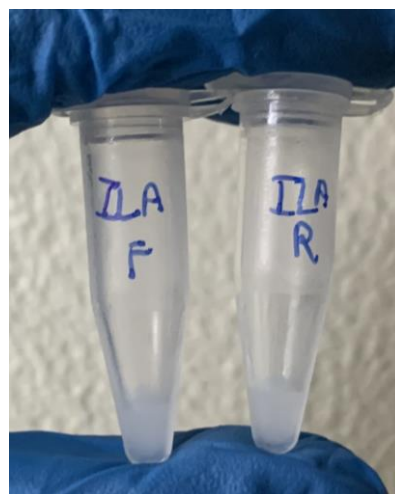


Figura 20: Aliquotagem dos primers IL1A_F e IL1A_R



Figura 21: Primers IL1B_F e IL1B_R

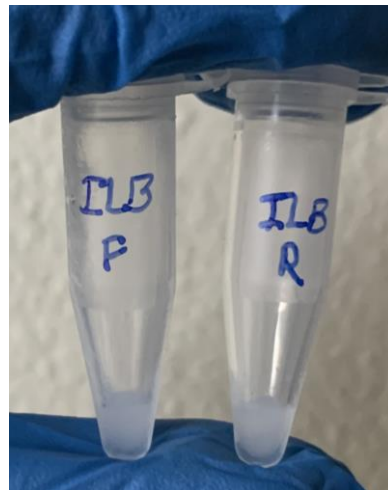


Figura 22: Aliquotagem dos primers IL1B_F e IL1B_R

As reações de amplificação foram realizadas num termociclador (MJ MINITM Personal Thermal Cycler). Seguindo o protocolo descrito por Kornman et al. (1997), para o polimorfismo do gene IL-1A na posição -889, foi realizado um ciclo de 96°C durante 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C, 1 minuto. Por fim, foi realizado um ciclo de 72°C durante 5 minutos. Para o polimorfismo do gene IL-1B na posição +3954 foi realizado numa primeira etapa um ciclo de 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 54°C 35 segundos e 72°C 30 segundos. Posteriormente foi realizado um ciclo de 72°C durante 5 minutos. Para o gene

IL-RN (intrão 2, VNTR) foi realizado um ciclo de 96°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, 70°C durante 2 min. Para terminar, foi realizado um ciclo de 70°C durante 5 minutos.

Tabela 4: Sequência dos *primers* escolhidos para cada um dos polimorfismos genéticos em estudo.

Adaptado de (Kornman, 1997).

<i>Primers/Iniciadores</i>	<i>Sequência</i>
IL-1A ⁻⁸⁸⁹ (<i>Primer Foward</i>)	5'- AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC- 3'
IL-1A ⁻⁸⁸⁹ (<i>Primers Reverse</i>)	5'-TTACATATGAGCCTTCCATG-3'
IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ (<i>Primer Foward</i>)	5'- CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA-3'
IL-1B ⁺³⁹⁵⁴ (<i>Primer Reverse</i>)	5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG -3'
IL-1RN (intrão 2, VNTR) (<i>Primer Foward</i>)	5'-CTCAGCAACACTCCTAT -3'
IL-1RN (intrão 2, VNTR) (<i>Primer Reverse</i>)	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA -3'



Figura 23: Amostras dos genes IL-1A e IL-1B após técnica de PCR

10. Análise do polimorfismo *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)

A verificação das regiões polimórficas do tipo VNTR do gene IL-1RN (intrão 2) foi realizada por eletroforese do DNA amplificado em gel de agarose a 3%. Para a preparação do mesmo foram pesados 4,5g de agarose (SeaKem® LE Agarose) (Figura 24) num balão de erlenmeyer, adicionou-se 150 ml de TAE 1X (Tris Acetato EDTA) e

aqueceu-se o mesmo até se obter uma mistura homogênea. Após o seu arrefecimento, adicionou-se 5 µl de corante *red-safe* (Figura 23), colocou-se a solução dentro de uma cuba horizontal e perfez-se o resto da cuba com TAE 1X. O TAE 1X (Tris Acetato EDTA) funciona como um condutor de corrente elétrica/tampão. O corante *red-safe* é um corante de DNA, que penetra no interior das pontes de hidrogénio estabelecidas entre bases azotadas, fazendo com que seja possível a visualização das suas bandas no gel de agarose com luz ultravioleta.

Às amostras de DNA amplificadas, foram adicionados 5 µl de DNA *loading dye* (Azul de Bromofenol a 0,05%), o qual confere peso à molécula de DNA e permite a visualização da velocidade de migração na eletroforese.

Adicionou-se 15 µl do marcador escolhido no primeiro poço e 15 µl de DNA nos restantes poços, a correr a 100 mA. Para a visualização e documentação do gel de agarose, foi utilizado um transiluminador de luz ultravioleta e uma câmara fotográfica polaroid.

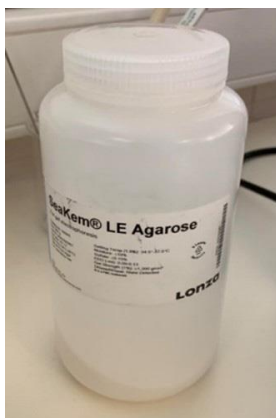


Figura 24: SEaKem® LE Agarose



Figura 25: Corante *red-safe*

11. Análise do *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Para a análise do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ foi realizada a técnica de RFLP. Para a sua confeção, foram colocados num novo tubo “eppendorf” de 1,5 ml, em primeiro lugar, 132 µl de RNase-free Water, de seguida 63 µl de NEBufferTM r3.1 (Figura 27) e por fim, 15 µl de enzima de restrição NcoI (Figura 26). Deste *Master Mix*, foram retirados 10 µl e colocados em novos tubos “eppendorf” PCR de 0,5 ml, devidamente numerados. Após a análise de PCR, foram retirados 20 µl de cada solução, obtendo-se um volume final em cada tubo numerado de 30 µl. De seguida, as amostras foram armazenadas a uma temperatura de 37°C *overnight* (Tabela 5).

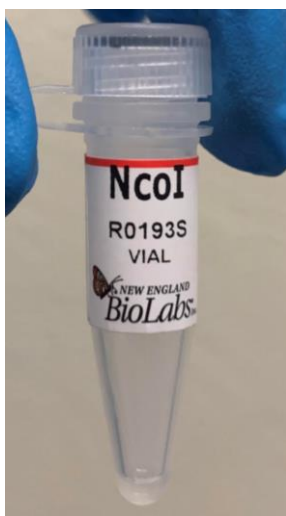


Figura 26: Enzima de restrição NcoI

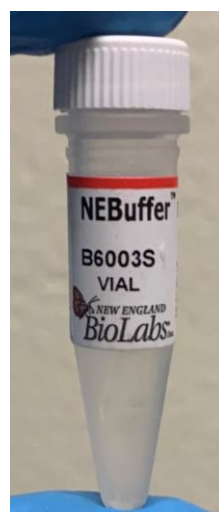


Figura 27: NEBuffer™ r.3.1

Os fragmentos resultantes foram separados por tamanho, através da eletroforese em gel de agarose a MetaPhor a 5%. Para a confecção do mesmo foram pesados 7,5g de agarose num balão de erlenmeyer e adicionados 150 ml de TAE 1X. Colocou-se o balão de erlenmeyer sobre um agitador magnético (RTCbasic IKA LABORTECHNIK), aquecendo-o, até se obter uma solução homogênea. Após o seu arrefecimento ligeiro, adicionou-se 5 µl de corante *red-safe*, colocou-se a solução dentro do molde do gel (cama) horizontal e deixou-se solidificar. O gel solidificado foi colocado na tina eletroforética e coberto com a solução de TAE 1X.

Após a digestão enzimática, foram adicionados às amostras 5 µl de *DNA loading dye* (Azul de bromofenol 0,05%). Foram colocados 15 µl de marcador e de DNA nos poços. Estabeleceu-se a corrente elétrica a 100 mA para a realização da eletroforese. Para a visualização e documentação do gel de agarose, foi utilizado um transiluminador de luz ultravioleta e uma camara fotográfica polaroid.

Este procedimento foi repetido para o polimorfismo da IL-1B⁺³⁹⁵⁴, com a diferença de que neste caso, foi utilizada a enzima de restrição TaqI (Figura 28) e o CutSmart®Buffer (Figura 27) e as amostras foram armazenadas a 65°C *overnight* (Tabela 5).



Figura 28: Enzima de restrição TaqI



Figura 29: CutSmart®Buffer

Tabela 5: Relação das endonucleases de restrição, temperatura e fragmentos esperados Adaptado de (Kornman, 1997).

Gene	Endonuclease de restrição	Temperatura (°C)	Fragmentos
IL-1A ⁻⁸⁸⁹	NcoI	37°C	83pb + 16 pb (alelo 1) 99pb (alelo 2)
IL-1B ⁺³⁹⁵⁴	TaqI	65°C	12pb + 85 pb+ 97pb (alelo 1) 12pb +182 pb (alelo 2)
IL-1RN (intrão 2-VNTR)	—	—	412 pb (alelo 1) 240 pb (alelo 2) 326 pb (alelo 3) 498 pb (alelo 4) 584 pb (alelo 5)

Tabela 6: Perfis de restrição das endonucleases.

Enzima de Restrição	Perfil de restrição
NcoI	5'-C/CATGG-3' 3'-GGTAC/C-5'
TaqI	5'-T/CGA-3' 3'-AGC/T-5'

12. Análise estatística

A análise estatística foi feita através do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Para o tratamento e análise dos dados foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial. A análise inferencial, permite testar se existe associação entre as variáveis estudadas. Para tal e tendo em conta que as variáveis a relacionar são do tipo qualitativo foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson e o teste exato de Fisher. De forma a testar-se as hipóteses que foram formuladas, fixou-se um valor de referência para se aceitar ou rejeitar a hipótese nula. Para tal, foi estabelecido que, para valores de $p \leq 0,05$ existe uma associação estatisticamente significativa.

O pressuposto para o uso do teste do Qui-quadrado (χ^2), consiste no facto de que não devem existir mais de 20% das células com frequências menores que 5. Quando tal não se verifica, a alternativa usada consiste no teste exato de Fisher, o qual é utilizado em tabelas 2x2. Tendo em conta que se obtiveram mais de 20% das células com uma frequência menor que 5, o teste exato de Fisher foi usado como alternativa ao teste do qui-quadrado.

IV. RESULTADOS

1. Análise das técnicas de PCR e PCR-RFLP

Através da análise dos géis de agarose (gel de agarose a 3% e gel de agarose MetaPhor a 5%) podem observar-se várias bandas, o que corresponde a diferentes possibilidades de genótipos para cada indivíduo.

No caso do polimorfismo da IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, quando as bandas observadas correspondem apenas ao alelo 1 (alelo sem alteração), significa que esses indivíduos são portadores do genótipo 1/1. Em contrapartida, quando as bandas visualizadas correspondem apenas ao alelo 2 (alelo mutado), teremos a presença de um genótipo 2/2. Por outro lado, se no gel de agarose que foi confeccionado (gel de agarose a 3%) for possível encontrar os pares de bases correspondentes tanto ao alelo 1 como ao alelo 2, isto significa, que esse indivíduo é portador de um genótipo 1/2.

No intrão 2 do gene IL-1RN é possível encontrar diferentes alelos de acordo com a repetição em tandem de uma sequência de 86 pb (Tabela 5). Para identificação das bandas, foi usado o marcador de pares de bases NZYDNA ladder VI.

Na figura 30 podemos observar os resultados desta mesma análise e concluir que, o indivíduo correspondendo ao número 5 apresenta 2 alelos diferentes, uma vez que é possível observar a presença de 2 bandas distintas, uma banda de 412pb (alelo 1) e outra banda de 326 pb (alelo 3). Para os restantes indivíduos, apenas se verifica a presença de uma banda de 412 pb, correspondente ao alelo 1.

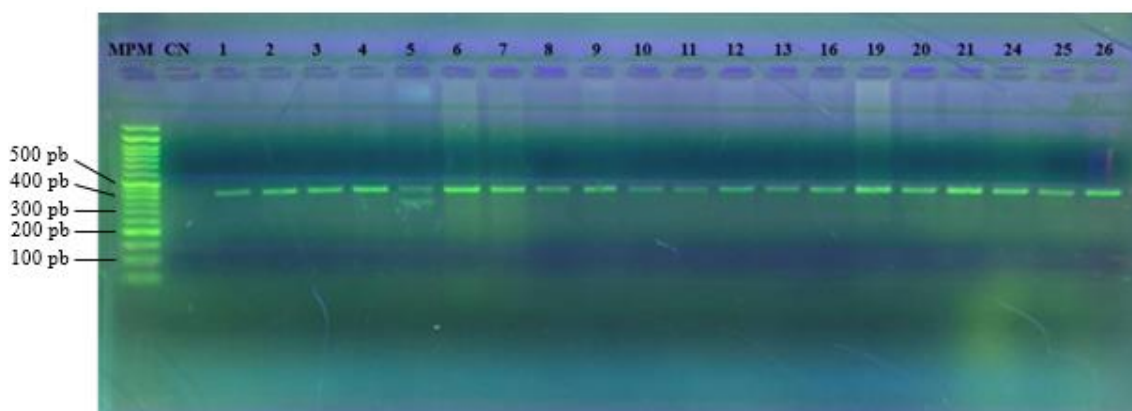


Figura 30: Gel de agarose a 3%, com os resultados para o gene IL-1RN (intrão 2-VNTR). MPM: Marcador de peso molecular, NZYDNA ladder VI; CN: controlo negativo; Grupo de controlo: pacientes nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; Grupo teste: pacientes nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.

Desta forma, todos os indivíduos foram considerados homozigóticos para o alelo 1 (genótipo 1/1), com exceção do indivíduo número 5, o qual foi considerado heterozigótico, sendo portador de um genótipo 1/3.

De acordo com o observado no gel de agarose e avaliando a amostra no seu total (n=20), é possível verificar que, no caso deste polimorfismo genético, existe uma maior prevalência do alelo 1 em relação ao alelo 3 (Gráfico 1).

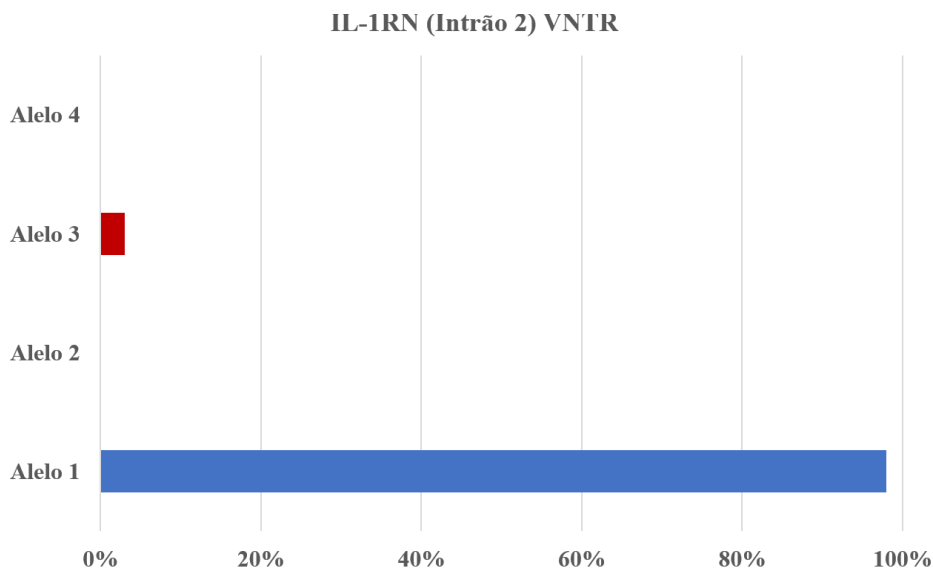


Gráfico 1: Frequência alélica do polimorfismo do gene IL-1RN

O SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) estudado ao nível do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴, caracteriza-se pela substituição de uma base de citosina (C) por uma base timina (T), originando dois possíveis alelos: alelo C e alelo T (Pociot et al., 1992).

Para a IL-1A, os fragmentos de digestão foram analisados num gel de agarose MetaPhor™ Agarose 5%, observando-se os seguintes perfis de restrição (5'-C/CATGG-3'): alelo 1 (C), 83pb + 16 pb e alelo 2 (T), 99pb (Figura 31). Para identificação das bandas, foi usado o marcador de peso molecular NZYDNA ladder VI e o pUC19/MspI (HpaII).

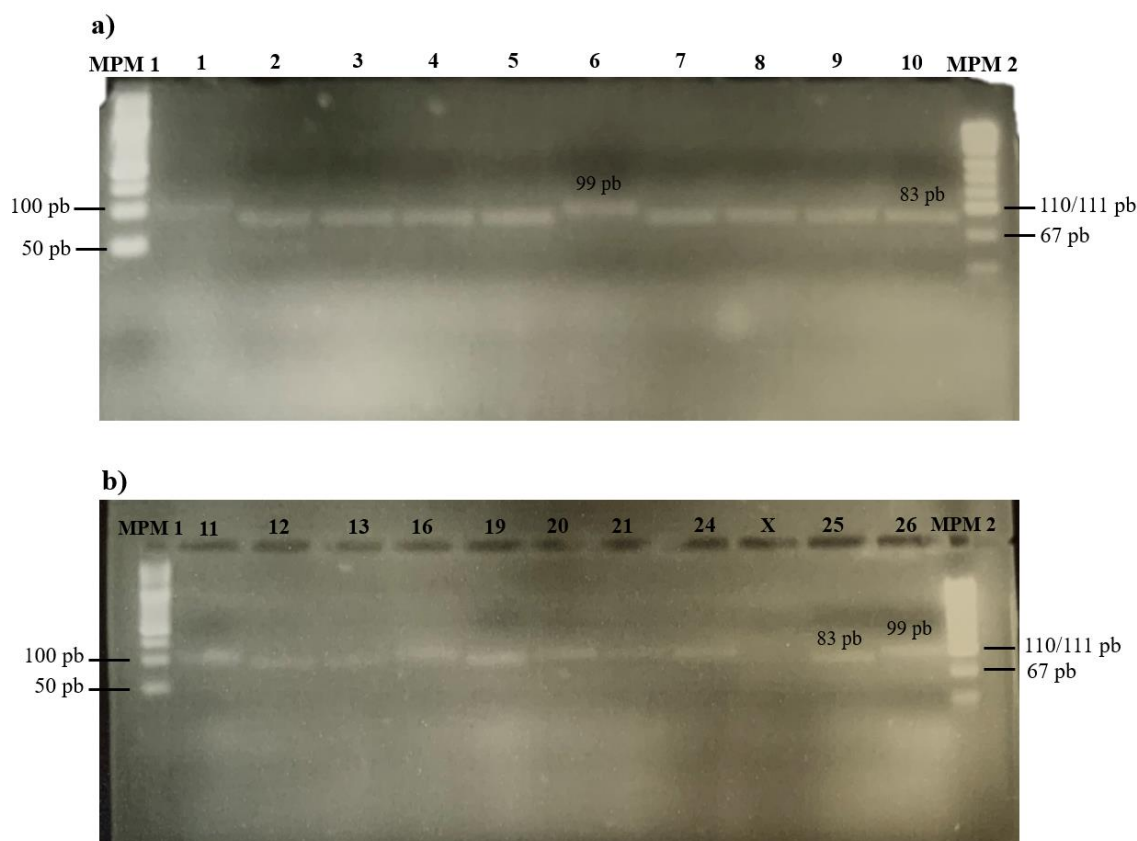


Figura 31: Perfil de restrição do fragmento do gene da IL-1A⁻⁸⁹⁹ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%, **(a)** desde a amostra nº1 até à amostra nº10 e **(b)** desde a amostra nº 11 até à amostra nº26. MPM 1: Marcador de peso molecular, NZYDNA ladder VI; MPM 2: Marcador de peso molecular, pUC19/MspI (HpaII) Marker; X: poço sem amostra; Os números acima dos poços correspondem ao código designado a cada paciente; grupo controlo: nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; grupo teste: nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.

De acordo com a figura 31, os indivíduos que são homozigóticos para o alelo 1 (alelo selvagem) apresentam dois fragmentos de digestão: 83 pb + 16 pb. Neste caso, apenas se observa o fragmento de 83 pb. Para os indivíduos homozigóticos para o alelo 2 (alelo mutado) verificamos a presença de um único fragmento de 99 pb. Nas amostras correspondentes aos números 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 19 e 25, apenas se observa a presença de uma banda de 83 pb, pelo que correspondem a pacientes homozigóticos para o alelo 1 (genótipo 1/1). Em relação aos indivíduos assinalados com os números 6, 11, 16 e 26, é possível visualizar a presença de um fragmento de 99pb, pelo que são considerados homozigóticos para o alelo 2, sendo portadores de um genótipo 2/2.

As bandas correspondentes às amostras 1, 2, 20, 21, 24, não são bem claras no que concerne ao seu peso molecular, pelo que foi realizado um novo gel de agarose utilizando estas mesmas amostras, bem como as restantes que indicaram a presença de 99pb (Figura

32). Para tal, foi também utilizado um marcador diferente (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder), que apresenta bandas mais próximas das que se pretendem visualizar.

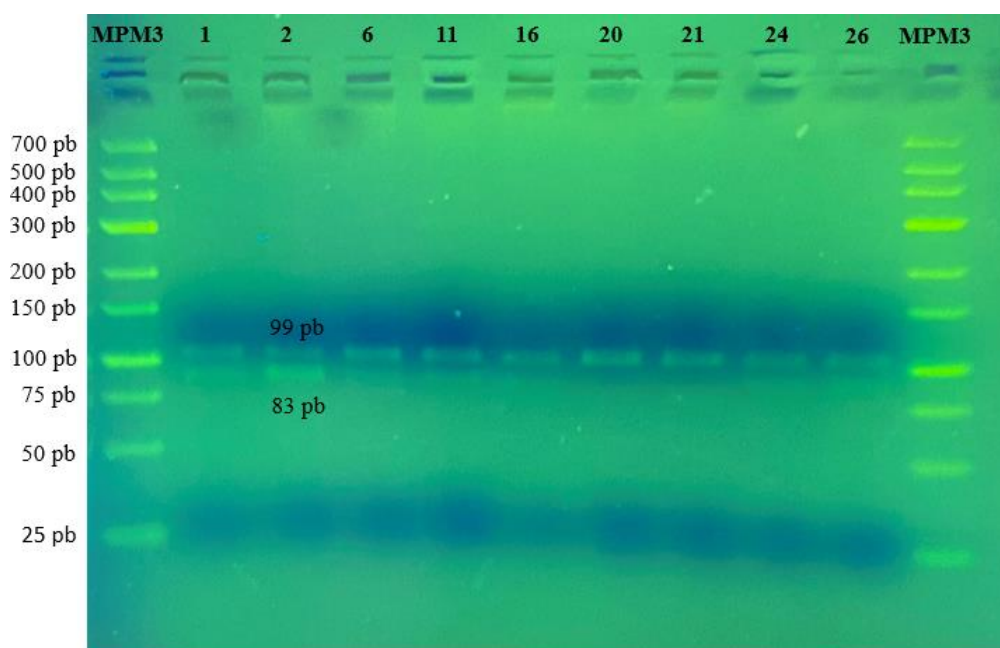


Figura 32: Repetição da restrição do fragmento do gene da IL-1A⁻⁸⁹⁹ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%, para as amostras 1, 2, 6, 11, 16, 20, 21, 24 e 26. MPM 3: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder.

De acordo com a figura 32, verifica-se que as amostras analisadas apresentam todas um fragmento de 99pb e outro fragmento de 83pb. Desta forma, concluiu-se que os indivíduos 1, 2, 6, 11, 16, 20, 21, 24, 26 são heterozigóticos apresentando um genótipo 1/2.

Avaliando a amostra no seu total, é possível verificar que, no caso deste polimorfismo genético, existe uma maior prevalência do alelo 1 (C) em relação ao alelo 2 (T) (Gráfico 2).

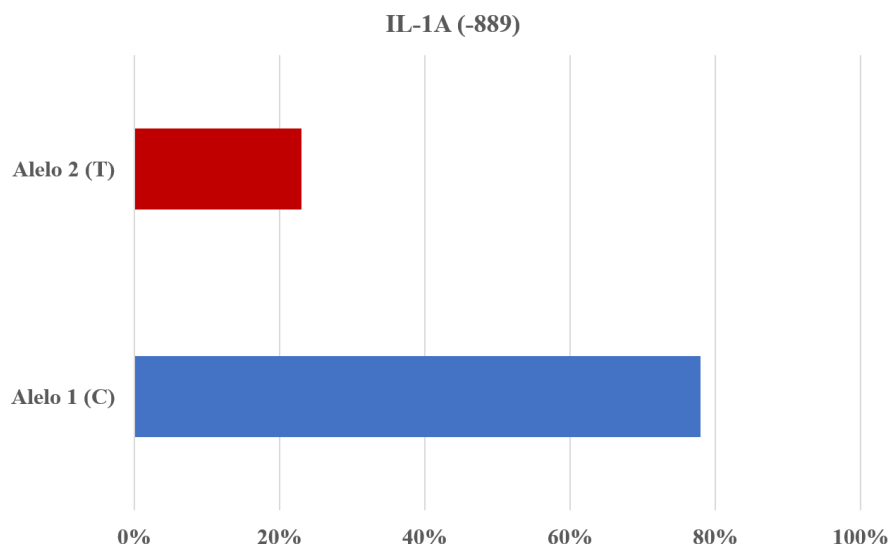


Gráfico 2: Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo do gene da IL-1A, no total da amostra

Para o polimorfismo do gene da IL-1B (IL-1B⁺³⁹⁵⁴), os fragmentos obtidos da restrição foram igualmente analisados num gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%, observando-se os seguintes perfis de restrição (5'-T/CGA-3'): alelo 1 (C), 97 + 85 + 12 pb; alelo 2 (T), 182 + 12 pb (Figura 33).

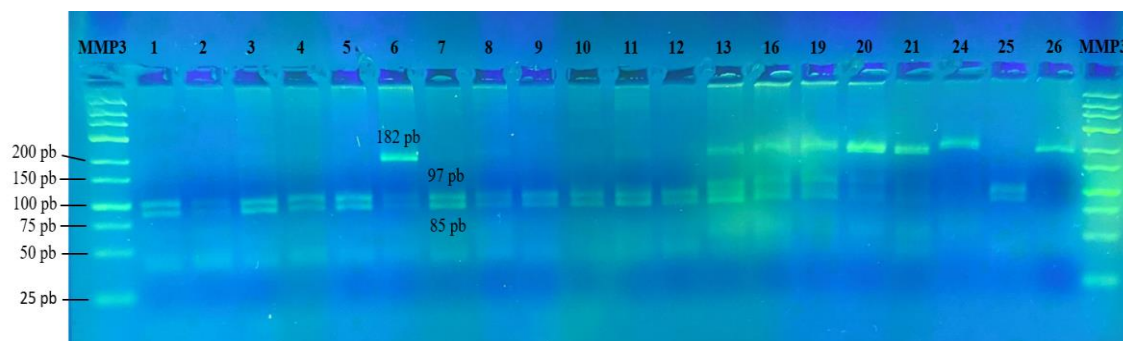


Figura 33: Perfil de restrição do fragmento do gene da IL-1B⁺³⁵⁹⁴ em gel de agarose MetaPhor™ Agarose a 5%. MPM 3: Marcador de peso molecular GeneRuler™ Low Range DNA Ladder. Os números acima dos poços correspondem ao código designado a cada paciente; grupo controle nº 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13; grupo teste: nº 1, 8, 12, 16, 19, 20, 21, 24, 25, 26.

Na figura 33, não são visíveis os fragmentos de 12 pb. Os indivíduos correspondentes aos números 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 25, apresentam uma banda de 97 pb e outra de 85 pb, sendo por isso homozigóticos para o alelo 1 (genótipo 1/1). Em relação à amostra número 24, apenas se observa um fragmento de 182 pb, pelo que se trata de um paciente homozigótico para o alelo mutado e por isso portador de um genótipo

2/2. As amostras 6, 13, 16, 19, 20, 21, 26, correspondem a pacientes heterozigotos, tendo em conta que é possível observar a presença de três fragmentos, 97 pb e 85 pb (correspondente ao alelo 1) e 182 pb (correspondente ao alelo 2). Desta forma, são portadores de um genótipo 1/2.

Analisando todos os indivíduos (n=20), é possível verificar que, no caso do polimorfismos da IL-1B⁺³⁹⁵⁴, existe uma maior frequência do alelo selvagem em relação ao alelo mutado (Gráfico 3).

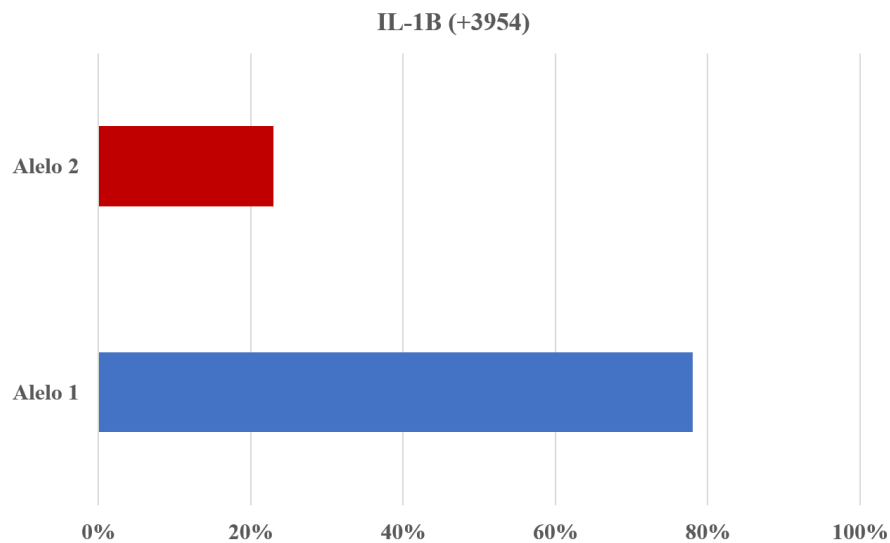


Gráfico 3: Prevalência dos alelos C e T no polimorfismo do gene da IL-1B, no total da amostra

2. Frequências alélicas

As frequências alélicas obtidas para os genes da IL-1RN VNTR, IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴, no grupo saúde peri-implantar, no grupo peri-implantite e para o total da amostra estão representadas na tabela 7.

Tabela 7: Frequências alélicas dos polimorfismos da IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), no grupo saúde peri-implantar e no grupo peri-implantite.

Alelos	Saúde Peri-implantar (n=20)	Peri-implantite (n=20)	Total (n=40)	p Value
IL-1RN VNTR				
1	19 (95%)	20 (100%)	39 (97,5%)	——
3	1 (5%)	0 (0%)	1 (2,5%)	
IL-1A (-889)				$p = 0,451$
C	17 (85%)	14 (70%)	31 (77,5%)	
T	3 (15%)	6 (30%)	9 (22,5%)	
IL-1B (+3954)				$p = 0,127$
C	18 (90%)	13 (65%)	31 (77,5%)	
T	2 (10%)	7 (35%)	9 (22,5%)	

No que diz respeito ao polimorfismo do gene da IL-1RN, no grupo saúde a frequência alélica para o alelo 1 foi de 95% e para o alelo 3 foi de 5%. No grupo doença as frequências alélicas foram de 100% e 0%, para o alelo 1 e 3 respetivamente (Tabela 7) (Gráfico 4).

Considerando a amostra total de alelos presentes neste polimorfismo nos 20 pacientes (n=40), observaram-se 39 (97,5%) alelos 1 e apenas 1 (2,5%) alelo 3 (Gráfico 4).

Para este polimorfismo não foi possível realizar a análise inferencial em virtude da não aplicabilidade do teste, tendo em conta as características das frequências observadas (Tabela 7).

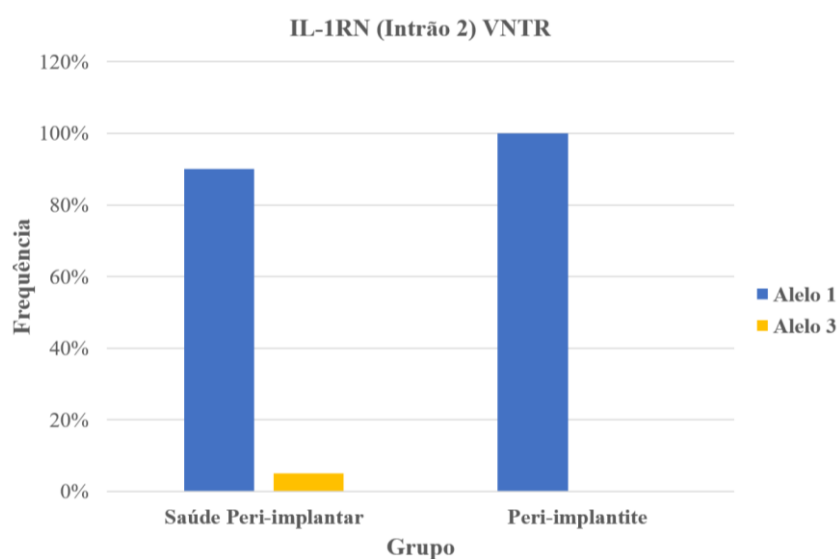


Gráfico 4: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1RN, em ambos os grupos.

No que diz respeito ao polimorfismo do gene da IL-1A, no grupo saúde a frequência alélica para o alelo C foi de 85% e para o alelo T foi de 15%. No grupo doença as frequências alélicas foram de 70% e 30%, para o alelo C e T respectivamente (Tabela 7) (Gráfico 5).

Considerando a amostra total de alelos presentes neste polimorfismo, nos 20 pacientes (n=40), observaram-se 31 (77,5%) alelos C e 9 (22,5%) alelos T (Tabela 7).

Foi possível realizar-se a análise inferencial, através da qual se obteve $p=0,451$ ($p>0,05\%$), pelo que não se rejeita a hipótese nula (Tabela 7).

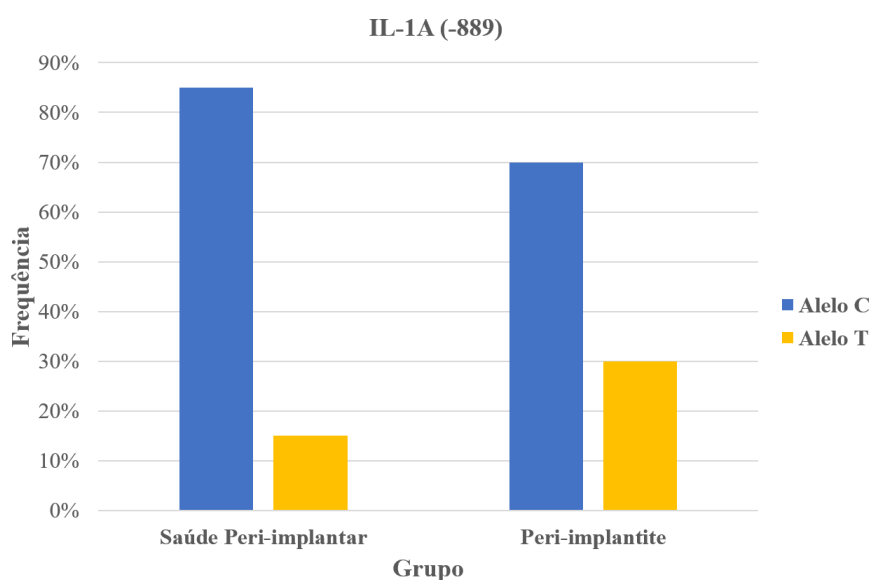


Gráfico 5: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1A, em ambos os grupos.

No que diz respeito ao polimorfismo do gene da IL-1B, no grupo saúde a frequência alélica para o alelo C foi de 90% e para o alelo T foi de 10%. No grupo doença as frequências alélicas foram de 65% e 35%, para o alelo C e T respectivamente (Tabela 7) (Gráfico 6).

Considerando o total de alelos presentes neste polimorfismo nos 20 pacientes (n=40), observaram-se o mesmo número de alelos C e T que aqueles registrados para o polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹ (Tabela 7).

Foi possível realizar a análise inferencial, no entanto não foi verificada associação, tendo em conta que o valor de $p=0,127$ (Tabela 7).

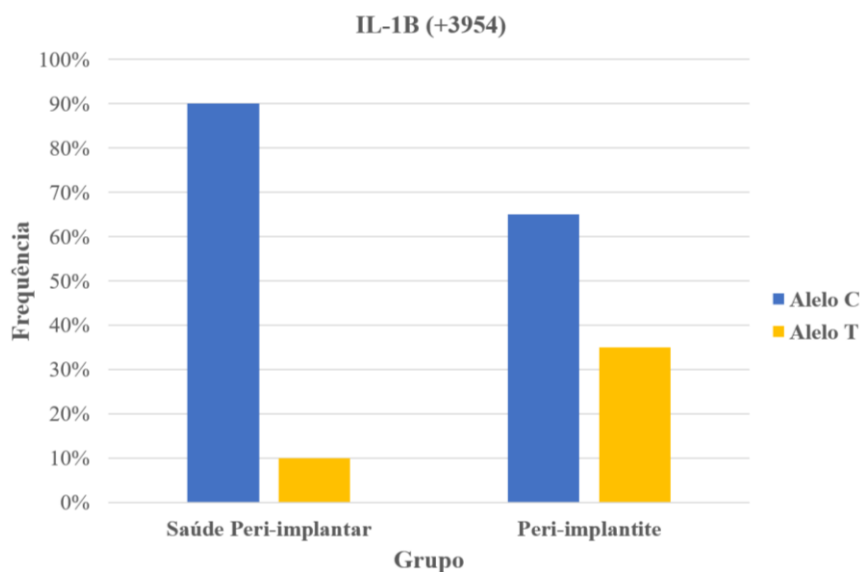


Gráfico 6: Frequência alélica no polimorfismo do gene da IL-1B, em ambos os grupos.

3. Frequências genotípicas

As frequências genotípicas obtidas para os genes da IL-1RN VNTR, IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴, no grupo saúde peri-implantar, no grupo peri-implantite e para o total da amostra estão representadas na tabela 8.

Tabela 8: Frequências genotípicas nos polimorfismos da IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e IL-1RN (intrão 2), no grupo saúde peri-implantar e no grupo peri-implantite.

Genótipo	Saúde Peri-implantar (n=10)	Peri-implantite (n=10)	Total (n=20)	p Value
IL-1 RN (Intrão 2) VNTR				
1/1	9 (90%)	10 (100%)	19 (95%)	—
1/3	1 (10%)	0 (0%)	1 (5%)	
IL-1A (-889)				p = 0,370
CC	7 (70%)	4 (40%)	11 (55%)	
CT	3 (30%)	6 (60%)	9 (45%)	
IL-1B (+3954)				—
CC	8 (80%)	4 (40%)	12 (60%)	
CT	2 (20%)	5 (50%)	7 (35%)	
TT	0 (0%)	1 (10%)	1 (5%)	

Para o polimorfismo da IL-1RN (intrão 2), considerando os indivíduos que constituem o grupo saudável, 9 (90%) apresentaram genótipo 1/1, enquanto que apenas 1 (10%) apresentou genótipo 1/3. Relativamente aos restantes 10 indivíduos que estão

inseridos no grupo peri-implantite, todos eles (100%) são portadores do genótipo 1/1 (Tabela 8) (Gráfico 7). Analisando a amostra em simultâneo para os pacientes de ambos os grupos sem se fazer distinção da sua condição (n=20), 19 (95,0%) são portadores de genótipo 1/1 e apenas 1 (5%) apresentam genótipo 1/3, pertencente ao grupo saúde (Tabela 8).

Para este polimorfismo, não foi possível realizar a análise inferencial (Tabela 8).

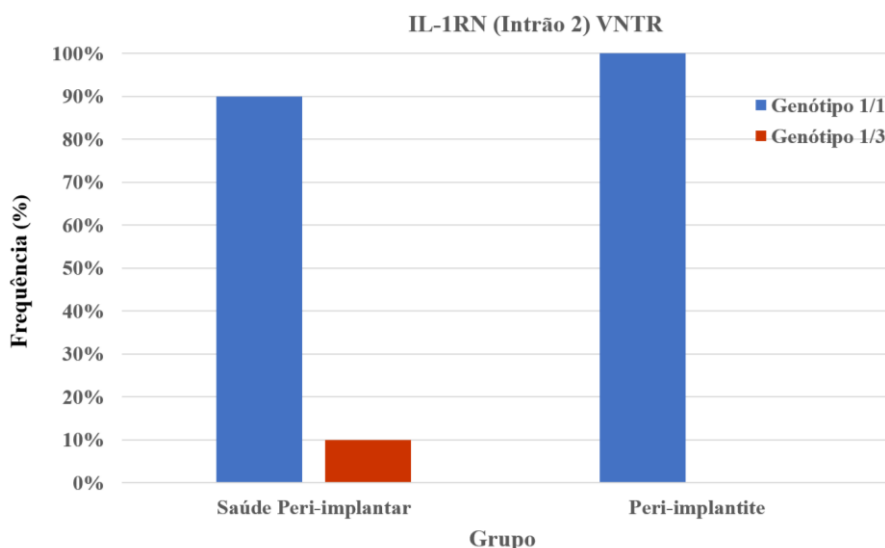


Gráfico 7: Frequência genotípica do polimorfismo do gene da IL-1RN (intrão 2) VNTR, para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite

Relativamente ao polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, dos 10 pacientes do grupo saudável, 7 (70%) apresentaram genótipo CC, enquanto que os restantes 3 (30%) evidenciaram a presença de genótipo CT. No grupo de peri-implantite, dos 10 pacientes que fazem parte do mesmo, 4 (40%) apresentaram genótipo CC e 6 (60%) um genótipo CT. O genótipo TT não foi observado em nenhum dos grupos (Tabela 8) (Gráfico 8). Analisando os dados obtidos para a amostra total, isto é, nos 20 pacientes envolvidos no estudos, cerca de 55,0% apresentaram um genótipo CC e 45,0% são portadores de um genótipo CT (Tabela 8).

Ao se proceder a avaliação dos valores de p , obteve-se um $p=0,370$ ($p>0,05\%$), pelo que não se rejeita a hipótese nula. Desta forma, conclui-se que não há associação estatisticamente significativa entre os genótipos apresentados para este polimorfismo e a presença de peri-implantite (Tabela 8).

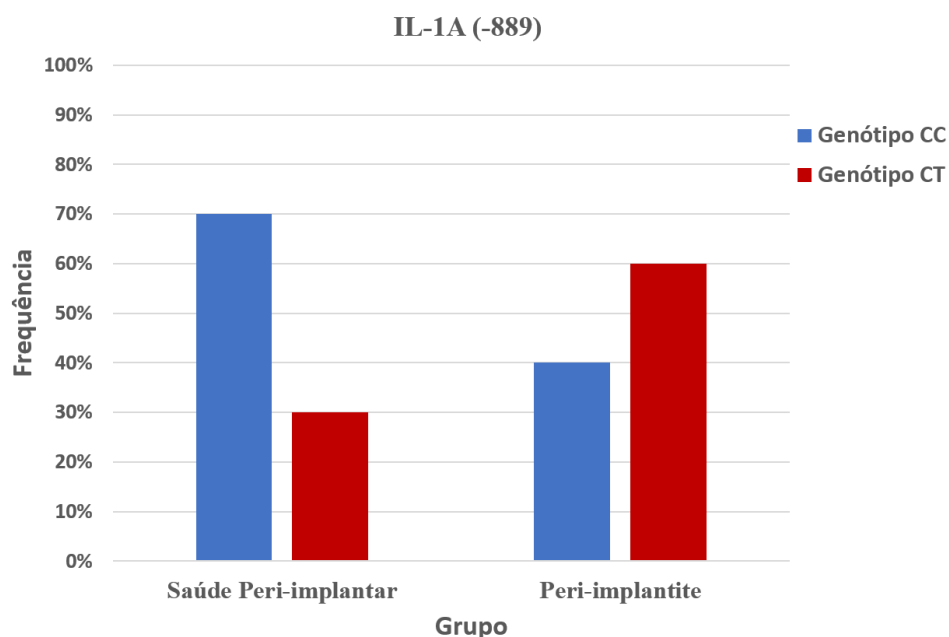


Gráfico 8: Frequência genotípica do polimorfismo IL-1A⁻⁸⁸⁹, para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite

No que concerne ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, no grupo saudável as frequências genotípicas foram de 80,0% para o genótipo CC, 20,0% para o genótipo CT e 0% para o genótipo TT. Para o grupo com peri-implantite diagnosticada, obteve-se uma frequência de 40,0% para genótipo CC, 50,0% para o genótipo CT e 10% para o genótipo TT (Tabela 8) (Gráfico 9). Considerando todos os indivíduos envolvidos no estudo, as frequências genotípicas observadas foram de 60,0% para o genótipo CC, 35,0% para o genótipo CT e 5,00% para o genótipo TT (Tabela 8). Para este polimorfismo, à semelhança do que foi constatado para o IL-1RN, não foi possível realizar a análise inferencial (Tabela 8).

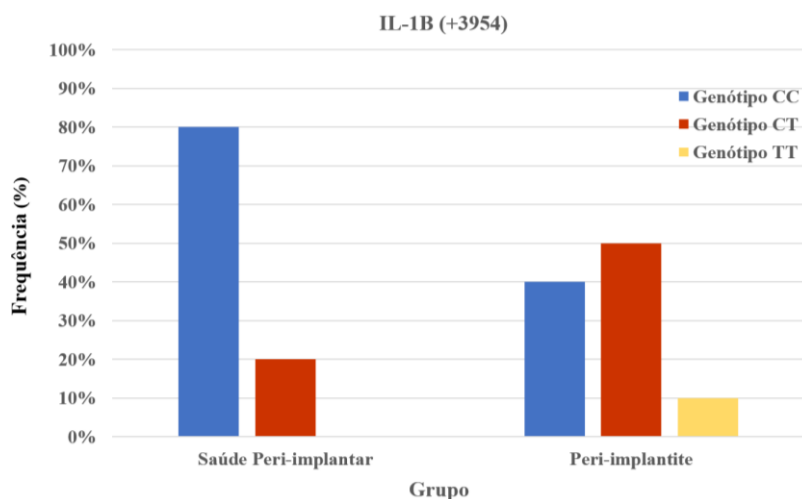


Gráfico 9: Frequência genotípica do polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, para o grupo saúde peri-implantar e grupo peri-implantite

4. Caracterização da amostra de acordo com a presença de genótipo positivo

Dos 10 pacientes do grupo saudável, apenas 1 (10%) apresenta genótipo positivo, enquanto que os restantes 9 (90%) não são portadores deste tipo de genótipo. No grupo de peri-implantite, dos 10 pacientes que o constituem, 5 (50%) apresentam genótipo positivo e os restantes 5 (50%) genótipo negativo. Analisando os dados para a amostra total (n=20), 6 (30%) dos pacientes apresenta genótipo positivo, enquanto que os restantes 14 (70%) apresentam genótipo negativo (Tabela 9).

Tabela 9: Genótipos positivos presentes na amostra

		Grupo				Total (n=20)	
		Saúde peri-implantar (n=10)		Peri-implantite (n=10)			
		n	%	n	%	n	%
Genótipo Positivo	Sim	1	10%	5	50%	6	30%
	Não	9	90%	5	50%	14	70%

Ao realizar-se a análise inferencial, obteve-se um $p=0,141$ ($p>0,05\%$), pelo que se conclui que não há associação entre a presença de genótipo positivo com a peri-implantite.

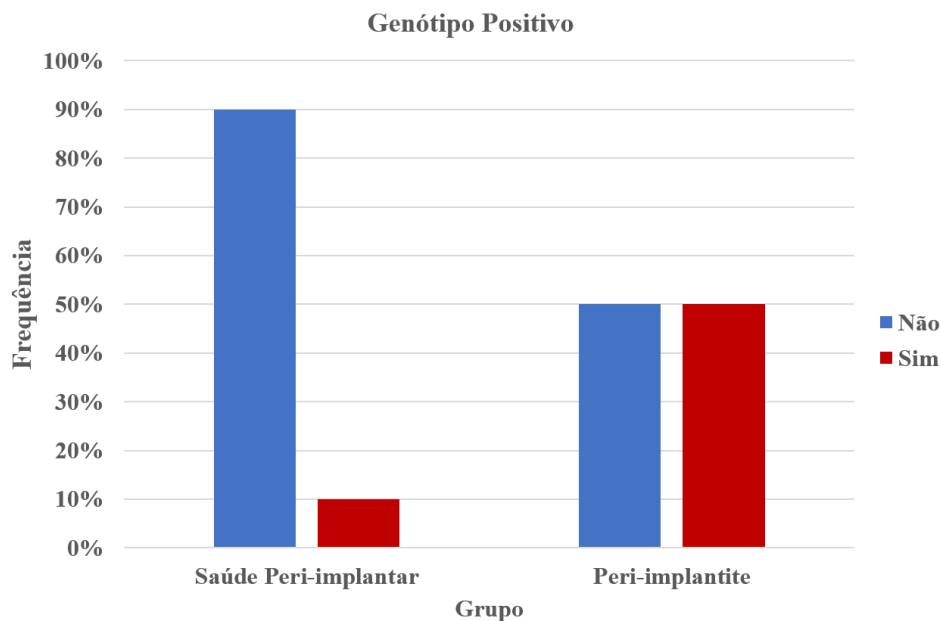


Gráfico 10: Distribuição do genótipo positivo entre o grupo saúde peri-implantar e o doença ($p>0,05$)

V. DISCUSSÃO

A IL-1 é dos principais reguladores da inflamação, sendo considerada um mediador importante a nível de doenças inflamatórias como é o caso da peri-implantite, desempenhando um papel importante no processo de destruição e reabsorção óssea (Dinarello, 1994). Desta forma, os polimorfismos que se desenvolvam nestes genes e que afetem a função e o nível de expressão das proteínas podem influenciar o desenvolvimento de doenças como a peri-implantite (Dominici et al., 2002; Van Deventer, 2000).

A maioria dos polimorfismos são do tipo polimorfismos de base única (SNPs), os quais apresentam uma frequência relativamente alta a nível do genoma humano e podem afetar a função dos genes onde ocorrem (Teama, 2018). Enquanto que o alelo T do IL-1A⁻⁸⁸⁹ tem vindo a ser associado a um aumento da expressão da interleucina-1 α , de acordo com Pociot et al. (1992), o alelo T do IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e a presença do alelo 2 no IL-1RN, têm vindo a ser associados com um aumento da produção de IL- β e diminuição de IL-1Ra, respetivamente.

As duas variações genéticas mais amplamente estudadas, no que diz respeito à possível relação com a peri-implantite e com a falha do implante são a IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T e a IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T, as quais têm demonstrado estar associadas com alterações a nível da expressão do gene e secreção de proteínas (Liao et al., 2014). O polimorfismo do IL-1A⁻⁸⁸⁹ está localizado na região promotora da IL-1A, sendo que a presença do alelo T tem sido associado a um aumento da atividade transcricional do gene. Em contrapartida o genótipo CC tem vindo a ser associado a uma diminuição da atividade transcricional e consequentemente a níveis mais baixos de interleucina-1 α , quando comparado com o genótipo TT. Por outro lado, o IL-1B⁺³⁹⁵⁴ encontra-se localizado no exão 5 do gene da IL-1B, sendo que a substituição do alelo C pelo alelo T vai provocar uma alteração semelhante à descrita anteriormente (Dominici et al., 2002)

Montes et al. (2009), realizou uma comparação de diversos estudos que analisam as frequências alélicas dos polimorfismos do IL-1RN e do IL-1B⁺³⁹⁵⁴ em diferentes populações, nomeadamente chinesa, japonesa, italiana, sueca e brasileira. Analisando os dados obtidos para os países Europeus estudados, Suécia e Itália, no que diz respeito à frequência alélica para o polimorfismo da IL-1B⁺³⁹⁵⁴, o alelo C foi mais prevalente que o alelo T. Já em relação ao polimorfismo da IL-1RN (intrão 2), o alelo 1 foi igualmente

mais comum que o alelo 2. Desta forma, os resultados do presente estudo, a nível da distribuição alélica para o total da população envolvida, vão ao encontro do que foi reportado por Montes et al. (2009) para a população Europeia Caucasiana estudada.

Além disso, no presente estudo a frequência do alelo mutado (alelo T) no polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ foi de 22,5% o que está de acordo com a frequência encontrada na população italiana referida nesse estudo.

No entanto, comparando os dados de todas as populações, embora com algumas discrepâncias entre eles, todas os países evidenciaram maior prevalência de alelo C no polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e do alelo 1 para o polimorfismo IL-1RN (intrão 2), verificando-se a mesma tendência a nível global e não só a nível Europeu (Montes et al., 2009).

Além disso, outro aspeto que se pode observar através da análise desses estudos, foi o facto de que a presença do alelo T do polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e do alelo 2 do polimorfismo da IL-1RN é algo bastante raro nos indivíduos chineses e japoneses, apresentando frequências consideravelmente baixas quando comparadas com os restantes países (Montes et al., 2009). Este facto pode servir de incentivo para a realização de mais estudos em diferentes grupos étnicos para se entender a real prevalência destes polimorfismos em diferentes grupos populacionais.

De acordo com um estudo realizado por Kornman et al. (1997), que foi o primeiro estudo que encontrou uma associação destes polimorfismos com a periodontite, existe a referência que a frequência do genótipo positivo é de 29.1% em indivíduos caucasianos do norte da Europa. Esse dado observado vai de encontro ao verificado no presente estudo, no qual se verificou que 30% de todos os participantes apresentavam pelo menos um alelo alterado nos dois genes IL-1A e IL-1B, nas posições -889 e +3954, respetivamente. De acordo com Kornman et al. (1997), pacientes portadores deste genótipo foram referidos como sendo mais suscetíveis de apresentarem um aumento de destruição dos tecidos periodontais.

No estudo conduzido por He et al. (2019), fizeram parte 144 doentes com peri-implantite diagnosticada e 174 doentes clinicamente saudáveis. Este estudo teve como objetivo analisar se as variações genéticas, que têm influência na regulação das respostas inflamatórias, tinham alguma associação com o risco do desenvolvimento de peri-implantite. Para tal, tentou analisar-se se existia ou não uma relação entre polimorfismos dos genes TNF- α , IL-1A e IL-1B e a peri-implantite, numa população chinesa não fumadora. No que diz respeito ao polimorfismo do gene da IL-1A, no grupo doença, a frequência do alelo C foi de 70,1% e a frequência do alelo T (alelo alterado) foi

de 29,9%. No grupo controle, as frequências foram de 84,2% e 15,8%, para o alelo C e T respectivamente. Desta forma, as frequências alélicas observadas no estudo de He et al. (2019), estão de acordo com as frequências alélicas obtidas no presente estudo, no qual, se observou uma frequência de 70% para o alelo C e de 30% para o alelo T no grupo peri-implantite e uma frequência de 85% e de 15% respectivamente, no grupo controle.

No que diz respeito ao polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴, He et al. (2019) observaram que, no grupo peri-implantite, a frequência alélica para o alelo C foi de 68,8% e para o alelo T de 31,2%, enquanto que no grupo saúde a frequência alélica foi de 79,9% para o alelo C e de 20,1% para o alelo T. Deste modo, verifica-se que estas frequências são similares às observadas no presente estudo, no qual se observou, uma frequência de 65% para o alelo C e 35% para o alelo T no grupo com peri-implantite e uma frequência de 90% para o alelo C e 10% para o alelo T no grupo saúde peri-implantar. Comparando ambos os estudos, para ambos os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ verifica-se uma maior percentagem de alelos T no grupo peri-implantite e uma maior percentagem de alelos C no grupo saúde.

He et al. (2019) concluíram que, tanto o polimorfismo genético IL-1A⁻⁸⁸⁹ C/T como o polimorfismo genético IL-1B⁺³⁹⁵⁴ C/T estão associados com um maior risco de desenvolvimento de peri-implantite. No presente estudo, não se observou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo saúde e o grupo doença, pelo que não se observou associação entre os polimorfismos IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com a peri-implantite. No entanto, embora não haja associação, verifica-se que existe uma possível tendência para que os indivíduos portadores destes polimorfismos genéticos sejam mais suscetíveis a desenvolverem peri-implantite, na medida em que os pacientes portadores desta doença, têm um maior número de alelos mutados (alelo T) e de genótipos CT e TT, comparativamente aos indivíduos com saúde peri-implantar.

Laine et al. (2006), elaboraram um estudo em que o principal objetivo consistiu em verificar a possível existência de uma associação entre polimorfismos dos genes da IL-1 e a peri-implantite. Foram incluídos 120 indivíduos caucasianos, 71 pacientes com peri-implantite (grupo teste) e 49 indivíduos com uma mucosa oral saudável e ausência de perda óssea em redor dos implantes (grupo controle). De acordo com os dados obtidos, nos pacientes pertencentes ao grupo doença, observou-se uma frequência de 47,8% de genótipo positivo (IL-1A⁻⁸⁸⁹ alelo 2 e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ alelo 2) e uma frequência de 26,2% dos genótipos com variante alélica IL-1A⁻⁸⁸⁹ (T) e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ (T) e IL-1RN VNTR alelo 2. Para os pacientes do grupo controle, foram obtidas frequências de 44,9% e 8,3%,

respetivamente. Nos indivíduos que apresentaram unicamente a presença do alelo 2 no IL-1A⁻⁸⁸⁹ e alelo 2 no IL-1B⁺³⁹⁵⁴, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos saúde e doença. Para a variante IL-1A⁻⁸⁸⁹ alelo T, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ alelo T e IL-1RN VNTR alelo 2, foi demonstrada uma associação significativa da mesma com o desenvolvimento de peri-implantite. Relativamente à presença de pelo menos um alelo 2 no gene da IL-1RN, foi observada uma frequência de 56,5% no grupo doença e uma frequência de 33,3% no grupo controlo. Desta forma, enquanto que em relação aos polimorfismos do gene IL-1A e IL-1B, não foi detetada associação dos mesmos, quer de forma isolada quer combinada, com a peri-implantite, Laine et al. (2006) concluíram, que os resultados obtidos no seu estudo fornecem evidência de que o polimorfismo do gene da IL-1RN está associado à peri-implantite e que poderá representar um fator de risco para a mesma. No entanto, contrariamente ao que foi observado por Laine et al. (2006), no presente estudo não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo saúde e o grupo peri-implantite quanto ao polimorfismo no gene IL-1RN.

Um estudo mais recente realizado por Saremi et al. (2021), teve como objetivo avaliar a frequência dos polimorfismos de base única (SNPs) da IL-10, IL-1B e TNF- α em pacientes saudáveis e em pacientes com peri-implantite, numa população iraniana. Para tal foram selecionados 50 pacientes com peri-implantite e 89 pacientes para o grupo controlo. Os resultados deste estudo indicaram que existe associação entre o polimorfismo IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com a peri-implantite, o que não vai de encontro ao verificado no presente estudo, no qual se observou não existir associação. Em contrapartida, Melo et al. (2011), num estudo realizado com um total de 47 pacientes, concluíram que não existiu associação do polimorfismo da IL-1B (IL-1B⁺³⁹⁵⁴) com a peri-implantite, o que vai de encontro ao observado no presente estudo.

Liao et al. (2014), procederam à elaboração de uma meta-análise com o objetivo de estudar a relação entre os polimorfismos da IL-1 (IL-1A e IL-1B) e o risco de falha/complicações ao nível de implantes dentários. Não foi incluído o polimorfismo do gene IL-1RN (VNTR) na meta-análise, uma vez que até à data existiam apenas três estudos publicados sobre o mesmo. Num total de 13 estudos incluídos, apenas quatro destes apresentaram dados suficientes no que diz respeito à relação entre genótipo positivo IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e a peri-implantite. Desta forma, com a realização da meta-análise, e ao contrário do que se verificou no presente estudo realizado, a mesma concluiu que, em descendentes europeus caucasianos, existe uma associação significativa entre o

genótipo positivo IL-1A⁻⁸⁸⁹ e IL-1B⁺³⁹⁵⁴ com a perda do implante/ falha do implante e com a peri-implantite.

Apesar de alguma concordância entre os resultados obtidos no presente estudo e os estudos acima referidos, principalmente no que diz respeito às frequências alélicas verificadas para os alelos com e sem alteração entre os grupos saúde e doença, verificaram-se algumas diferenças quanto à influência destes polimorfismos no desenvolvimento da peri-implantite. Essas divergências podem estar relacionadas com as diferenças quanto à etnia dos grupos incluídos. No presente estudo incluíram-se indivíduos Caucasianos do sul da Europa, enquanto que no estudo de Laine et al. (2006) foram recrutados indivíduos caucasianos do norte da Europa, no estudo de He et al. (2019), foram incluídos pacientes de origem Asiática e no estudo de Saremi et al. (2021), apenas participaram indivíduos iranianos. Também se verificaram diferenças a nível dos hábitos tabágicos entre os estudos publicados. No presente estudo incluíram-se pacientes fumadores, no estudo de Laine et al. (2006) foram também incluídos pacientes fumadores e não fumadores, enquanto que no estudo de He et al. (2019) não foram selecionados pacientes fumadores. Por outro lado, este estudo consiste num estudo piloto com 20 doentes. Analisando e comparando com o tamanho da amostra dos restantes estudos, no caso de Laine et al. (2006) a amostra foi de 120 pacientes, no de He et al. (2019) foram incluídos 318 pacientes no total e um total de 139 indivíduos participaram no estudo de Saremi et al (2021).

Provavelmente com uma amostra maior poderíamos observar diferenças estatisticamente significativas, quanto à presença destes polimorfismos, entre o grupo saúde e doença. De facto, verificou-se uma diferença, ainda que não seja estatisticamente significativa, quanto às frequências dos alelos alterados nos genes IL-1A e IL-1B, nas posições -889 e +3954 respetivamente, entre o grupo saúde e doença.

VI. CONCLUSÃO

Mais de 2 milhões de implantes dentários são colocados no mundo todo, todos os anos. Este tipo de reabilitação apresenta taxas de sucesso e sobrevivência elevadas, contudo podem surgir complicações biológicas, como a peri-implantite cujo tratamento implica imprevisibilidade, e em última instância podem levar à perda do implante. A sua alta prevalência é um problema de saúde pública cujo tratamento acarreta grandes custos para a comunidade e muitas vezes não consegue controlar a doença.

Essa inflamação apresenta uma etiologia bacteriana semelhante à encontrada em casos de periodontite, mas o seu aparecimento é, provavelmente, o resultado de vários fatores que podem influenciar a resposta inflamatória do hospedeiro, como o tabaco e variações genéticas em genes relevantes para a reação imunológica. Ao longo dos últimos anos, foi gerada a hipótese de que o background genético de um indivíduo pode modular quer a gravidade, quer o caráter progressivo das inflamações orais por meio da expressão de citocinas e dos seus moduladores.

A Interleucina-1 é considerada um mediador major a nível de doenças inflamatórias crônicas orais e sistêmicas.

A associação de polimorfismos genéticos da IL-1 e do IL-1Ra com o desenvolvimento da peri-implantite tem sido investigada ao longo dos últimos anos. Dentro dos estudos realizados até à data sobre este tema, os resultados obtidos têm sido controversos, mantendo-se esta possível associação inconclusiva.

De acordo com os resultados observados no presente estudo, relativamente aos polimorfismos dos genes da IL-1, não se observou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo saúde e doença, pelo que não houve associação entre os polimorfismos genéticos da IL-1A (IL-1A⁻⁸⁸⁹), IL-1B (IL-1B⁺³⁹⁵⁴) e o desenvolvimento da peri-implantite. No entanto, embora não se tenha encontrado associação, verifica-se que existe uma possível tendência para que os indivíduos portadores destes polimorfismos genéticos sejam mais suscetíveis a desenvolverem peri-implantite, na medida em que os pacientes com peri-implantite apresentam um maior número de alelos mutados (alelo T), comparativamente aos indivíduos com saúde peri-implantar. A nível do polimorfismo IL-1RN (intrão 2), não foi possível avaliar a sua associação com a doença peri-implantar.

No que concerne às frequências alélicas e genótípicas encontradas, estas são semelhantes às encontradas nas populações europeias.

Os resultados descritos na evidência científica atual, são promissores no que diz respeito ao papel dos fatores genéticos, como é o caso dos polimorfismos estudados, no desenvolvimento da peri-implantite. No entanto, o número de estudos presentes na literatura relativo a esta associação é bastante limitado, sendo que alguns deles não fazem referência a variáveis que podem ter impacto/influenciar os resultados obtidos (variáveis de confusão), tais como a situação periodontal dos indivíduos da amostra, a etnia dos mesmos e a presença ou não de hábitos tabágicos. Desta forma e devido às desigualdades verificadas entre os estudos já publicados na literatura, para que haja uma melhor compreensão sobre esta possível associação é necessário que sejam criados critérios uniformes entre os estudos futuros. Além disso, estudos com amostras maiores em diferentes grupos étnicos são necessários para determinar o real efeito dos polimorfismos genéticos nesta doença. No futuro, serão necessários realizar mais estudos nesta área, com amostras maiores, de forma a que seja possível identificar e obter resultados com maior exatidão e evidência no que concerne à relação dos polimorfismos da IL-1A⁻⁸⁸⁹, IL-1B⁺³⁹⁵⁴ e da IL-1RN intrão 2 com o desenvolvimento da peri-implantite.

O conhecimento da base genética da peri-implantite pode ajudar na previsão da ocorrência da doença, melhorar o seu tratamento, assim como auxiliar a monitorização de pacientes com implantes dentários.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Al-Koofee, D. A. F., & Mubarak, S. M. H. (2020). Genetic Polymorphisms. In M. Çalışkan, O. Erol, & G. C. Öz (Eds.), *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms* (pp.1-15). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88063>
- Alassy, H., Parachuru, P., & Wolff, L. (2019). Peri-implantitis diagnosis and prognosis using biomarkers in peri-implant crevicular fluid: A narrative review. *Diagnostic*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040214>
- Aldahlawi, S. (2018). Dental Implant Maintenance for the General Dentist : When , Why and What to do?. *EC Dental Science*, 17(9), 1570–1581. <https://www.econicon.com/ecde/pdf/ECDE-17-00780.pdf>
- Andreiotelli, M., Koutayas, S.-O., Madianos, P. N., & Strub, J.-R. (2008). Relationship between interleukin-1 genotype and peri-implantitis: a literature review. *Quintessence International*, 39(4), 289–298. <https://www.quintessence-publishing.com/deu/en/article/839984>
- Berg, H. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In Dr Sameh Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (pp. 315-334). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/37724>
- Berglundh, T., Abrahamsson, I., Welander, M., Lang, N. P., & Lindhe, J. (2007). Morphogenesis of the peri-implant mucosa: An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01380.x>
- Berglundh, T., Armitage, G., Araujo, M. G., Avila-Ortiz, G., Blanco, J., Camargo, P. M., Chen, S., Cochran, D., Derks, J., Figuero, E., Hämmerle, C. H. F., Heitz-Mayfield, L. J. A., Huynh-Ba, G., Iacono, V., Koo, K. T., Lambert, F., McCauley, L., Quirynen, M., Renvert, S., ... Zitzmann, N. (2018). Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 286–291. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12957>
- Bermingham, N., & Luetlich, K. (2003). Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 9(3), 159–164. <https://doi.org/10.1016/S0968->

6053(02)00102-3

- Brettschneider R. (1998) RFLP Analysis. In: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity* (pp.85-95). Springer, Dordrecht
https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_18
- Brodzikowska, A., Górska, R., & Kowalski, J. (2019). Interleukin-1 Genotype in Periodontitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67(6), 367–373. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00555-4>
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Derks, J., Schaller, D., Håkansson, J., Wennström, J. L., Tomasi, C., & Berglundh, T. (2016). Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Prevalence of Peri-implantitis. *Journal of Dental Research*, 95(1), 43–49. <https://doi.org/10.1177/0022034515608832>
- Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*, 17(8), 906–913. <https://doi.org/10.1038/ni.3503>
- Dinarello, C. A. (1994). The biological properties of interleukin-1. In *European Cytokine Network*, 5(6), 517–531. <https://europepmc.org/article/med/7727685>
- Dinarello, C. A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 20(5), 1–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14989423/>
- Dominici, R., Cattaneo, M., Malferrari, G., Archi, D., Mariani, C., Grimaldi, L., & Biunno, I. (2002). Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 α . *Immunogenetics*, 54(2), 82–86. <https://doi.org/10.1007/s00251-002-0445-9>
- Dreyer, H., Grischke, J., Tiede, C., Eberhard, J., Schweitzer, A., Toikkanen, S. E., Glöckner, S., Krause, G., & Stiesch, M. (2018). Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 53(5), 657–681. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>
- Feloutzis, A., Lang, N. P., Tonetti, M. S., Bürgin, W., Brägger, U., Buser, D., Duff, G. W., & Kornman, K. S. (2003). IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for peri-implant bone loss in a well-maintained population. *Clinical Oral Implants Research*, 14(1), 10–17. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.140102.x>
- Fourmoussis, I., & Vlachos, M. (2019). Genetic Risk Factors for the Development of Periimplantitis. *Implant Dentistry*, 28(2), 103–114.

- <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000874>
- Froum, S., & Rosen, P. (2012). A proposed classification for peri-implantitis . *Int J Periodontics Restorative Dent. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 32(5), 533–540.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391–401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Greenstein, G., & Hart, T. C. (2002). A Critical Assessment of Interleukin-1 (IL-1) Genotyping When Used in a Genetic Susceptibility Test for Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 73(2), 231–247. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.2.231>
- Grigoriadou, M. E., Koutayas, S.-O., Madianos, P. N., & Strub, J.-R. (2010). Interleukin-1 as a genetic marker for periodontitis: review of the literature. *Quintessence International*, 41(6), 517–525. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490394>
- Gruica, B., Wang, H. Y., Lang, N. P., & Buser, D. (2004). Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research*, 15(4), 393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01026.x>
- Hamdy, A. A. E. M. M., & Ebrahim, M. A. E. M. (2011). The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a-889 and IL-1b+3954) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: Case-control study. *Journal of Oral Implantology*, 37(3), 325–334. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-09-00117.1>
- He, K., Jian, F., He, T., Tang, H., Huang, B., & Wei, N. (2020). Analysis of the association of TNF- α , IL-1A, and IL-1B polymorphisms with peri-implantitis in a Chinese non-smoking population. *Clinical Oral Investigations*, 24(2), 693–699. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02968-z>
- Heitz-Mayfield, L. J. A. (2008). Peri-implant diseases: Diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8), 292–304. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01275.x>
- Heitz-Mayfield, L. J. A., & Lang, N. P. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology 2000*, 53(1), 167–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00348.x>

- Henriques, P. S. G., Rodrigues, A. E. A., Peruzzo, D. C., Okajima, L. S., & Trevensolli, N. (2016). Prevalence of peri-implant mucositis. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 64(3), 307–311. <https://doi.org/10.1590/1981-8637201600030000103009>
- Hu, Z., Shao, M., Chen, Y., Zhou, J., Qian, J., Xu, L., Ma, H., Wang, X., Xu, Y., Lu, D., & Shen, H. (2006). Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene (IL1RN*2) is associated with a decreased risk of primary lung cancer. *Cancer Letters*, 236(2), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.05.015>
- Hultin, M., Gustafsson, A., Hallström, H., Johansson, L. Å., Ekfeldt, A., & Klinge, B. (2002). Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 13(4), 349–358. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130402.x>
- Ismail, S., & Essawi, M. (2012). *Genetic polymorphism studies in humans*, 1(2), 57–63. <https://doi.org/10.1097/01.MXE.0000415225.85003.47>
- Jaber, B. L., Liangos, O., Pereira, B. J. G., & Balakrishnan, V. S. (2004). Polymorphism of immunomodulatory cytokine genes: Implications in acute renal failure. In *Blood Purification*, 22(1), 101–111. <https://doi.org/10.1159/000074930>
- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>
- Kinane, D. F., & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14(6), 430–449. <https://doi.org/10.1177/154411130301400605>
- Kinane, Denis F., Shiba, H., & Hart, T. C. (2005). The genetic basis of periodontitis. In *Periodontology 2000*, 39 (1), 91–117. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00118.x>
- Koldsland, O. C., Scheie, A. A., & Aass, A. M. (2010). Prevalence of Peri-Implantitis Related to Severity of the Disease With Different Degrees of Bone Loss. *Journal of Periodontology*, 81(2), 231–238. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090269>
- Kornman, K. S. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. In *Journal of Clinical Periodontology*, 24(1), 72–77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb01187.x>
- Kornman, K. S. (2006). Interleukin 1 genetics, inflammatory mechanisms, and nutrigenetic opportunities to modulate diseases of aging. *American Journal of*

- Clinical Nutrition*, 83(2), 475-483. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.475s>
- Lachmann, S., Kimmerle-Müller, E., Axmann, D., Scheideler, L., Weber, H., & Haas, R. (2007). Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A -889 and IL-1B + 3954 genotype: A cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-. *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), 212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01322.x>
- Laine, M. L., Leonhardt, Å., Roos-Jansåker, A. M., Peña, A. S., Van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., & Renvert, S. (2006). IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 17(4), 380–385. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01249.x>
- Lang, N. P., & Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: Where are we now? - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 178–181. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>
- Liao, J., Li, C., Wang, Y., Ten, M. H., Sun, X., Tian, A., Zhang, Q., & Liang, X. (2014). Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 2789–2798. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3133-6>
- Maney, P., Schiavo, J. H., Mascarenhas, F., & Dragonas, P. (2020). Risk Factors for Peri-implantitis. *Current Oral Health Reports*, 7(3), 234–248. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00276-0>
- Mcdowell, T. L., Symons, J. A., Ploski, R., FØRre, Øy., & Duff, G. W. (1995). A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 α polymorphism. *Arthritis & Rheumatism*, 38(2), 221–228. <https://doi.org/10.1002/art.1780380210>
- Melo, R.F., Lopes, B.M.V., Shibli, J.A., Marcantonio Junior, E., Marcantonio, R.A.C. and Galli, G.M.T. (2012), Interleukin-1 β and Interleukin-6 Expression and Gene Polymorphisms in Subjects with Peri-Implant Disease. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(6), 905-914. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00325.x>
- Mir-Mari, J., Mir-Orfila, P., Figueiredo, R., Valmaseda-Castellón, E., & Gay-Escoda, C. (2012). Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a

- private practice environment. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(5), 490–494. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01872.x>
- Mombelli, A., & Décaillet, F. (2011). The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(11), 203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01666.x>
- Montes, C. C., Alvim-Pereira, F., De Castilhos, B. B., Sakurai, M. L. L., Olandoski, M., & Trevilatto, P. C. (2009). Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clinical Oral Implants Research*, 20(2), 208–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01629.x>
- Nicklin, M. J., Weith, A., & Duff, G. W. (1994). A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics*, 19(2), 382–384. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1076>
- Oliveira, F. L. A. de, Azevedo, M. J. N. de, Barbosa, A. N., Rodrigues, R. de S., Reis, R. dos S., & Rocha, D. A. P. (2015). Use of different Taq DNA polymerases for detection of Chlamydia trachomatis in cervical samples. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 6(4), 19–24. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232015000400003>
- Persson, G. R., & Renvert, S. (2014). Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(6), 783–793. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>
- Petkovic-Curcin, A., Zeljic, K., Cikota-Aleksic, B., Dakovic, D., Tatic, Z., & Magic, Z. (2017). Association of Cytokine Gene Polymorphism with Peri-implantitis Risk. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 32(5), 241–248. <https://doi.org/10.11607/jomi.5814>
- Pociot, F., MØlvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., & Nerup, J. (1992). A TaqI polymorphism in the human interleukin-1β (IL-1β) gene correlates with IL-1β secretion in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*, 22(6), 396–402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01480.x>
- Preshaw, P. M., & Heasman, P. A. (2002). Prostaglandin E2 concentrations in gingival crevicular fluid: Observations in untreated chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(1), 15–20. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290103.x>
- Rakic, M., Grusovin, M., & Canullo, L. (2016). The Microbiologic Profile Associated

- with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 31(2), 359–368. <https://doi.org/10.11607/jomi.4150>
- Ransjö, M., Marklund, M., Persson, M., & Lerner, U. H. (1998). Synergistic interactions of bradykinin, thrombin, interleukin 1 and tumor necrosis factor on prostanoid biosynthesis in human periodontal- ligament cells. *Archives of Oral Biology*, 43(4), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(98\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(98)00010-7)
- Renvert, S., Persson, G. R., Pirih, F. Q., & Camargo, P. M. (2018). Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 278–285. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12956>
- Renvert, S., & Quirynen, M. (2015). Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clinical Oral Implants Research*, 26(11), 15–44. <https://doi.org/10.1111/clr.12636>
- Rokn, A., Aslroosta, H., Akbari, S., Najafi, H., Zayeri, F., & Hashemi, K. (2017). Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. *Clinical Oral Implants Research*, 28(3), 314–319. <https://doi.org/10.1111/clr.12800>
- Santtila, S., Savinainen, K., & Hurme, M. (1998). Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production in vitro. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47(3), 195–198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00300.x>
- Saremi, L., Shafizadeh, M., Esmailzadeh, E., Ghaffari, M. E., Mahdavi, M. H., Amid, R., & Kadkhodazadeh, M. (2021). Assessment of IL-10, IL-1 β and TNF- α gene polymorphisms in patients with peri-implantitis and healthy controls. *Molecular biology reports*, 48(3), 2285–2290. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06253-9>
- Schwarz, F., Derks, J., Monje, A., & Wang, H. L. (2018). Peri-implantitis. In *Journal of periodontology*, 89(1), 267–290. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0350>
- Shimchuk, A. A., Weinstein, B. F., & Daubert, D. M. (2020). Impact of a change in classification criteria on the prevalence of peri-implantitis: A cross-sectional analysis. *Journal of Periodontology*, 92(1), 1339–1346. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0566>
- Smeets, R., Henningsen, A., Jung, O., Heiland, M., Hammächer, C., & Stein, J. M. (2014).

- Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review. In *Head and Face Medicine*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-10-34>
- Smittipat, N., Billamas, P., Palittapongarnpim, M., Thong-On, A., Temu, M. M., Thanakijcharoen, P., Karnkawinpong, O., & Palittapongarnpim, P. (2005). Polymorphism of variable-number tandem repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5034–5043. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5034-5043.2005>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0)
- Syrovets, T., Jendrach, M., Rohwedder, A., Schüle, A., & Simmet, T. (2001). Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKK β -mediated NF- κ B activation. *Blood*, 97(12), 3941–3950. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3941>
- Tarlow, J. K., Blakemore, A. I. F., Lennard, A., Solari, R., Hughes, H. N., Steinkasserer, A., & Duff, G. W. (1993). Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. In *Human Genetics*, 91(4), 403–404. <https://doi.org/10.1007/BF00217368>
- Tatakis D. N. (1993). Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *Journal of periodontology*, 64(5), 416–431
- Teama, S. (2018). DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>
- Templeton, N. S. (1992). The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagnostic Molecular Pathology*, 1(1), 52–72. <https://doi.org/10.1097/00019606-199203000-00008>
- Tomasi, C., & Derks, J. (2012). Clinical research of peri-implant diseases - Quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(12), 207–223. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01831.x>

- Van Deventer, S. J. H. (2000). Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Medicine, Supplement*, 26(1), 98–102. <https://doi.org/10.1007/s001340051125>
- Wilson, V. (2013). An insight into peri-implantitis: a systematic literature review. *Primary Dental Journal*, 2(2), 69–73. <https://doi.org/10.1308/205016813806144209>
- Yin, X., Bunn, C. L., & Bartold, P. M. (2000). Detection of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor 2(PAI-2) in gingival crevicular fluid from healthy, gingivitis and periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(3), 149–156. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2000.027003149.x>
- Yousefi, S., Abbassi-Daloui, T., Kraaijenbrink, T., Vermaat, M., Mei, H., van 't Hof, P., van Iterson, M., Zhernakova, D. V., Claringbould, A., Franke, L., 't Hart, L. M., Sliker, R. C., van der Heijden, A., de Knijff, P., 't Hoen, P. A. C., Jansen, R., van Meurs, J. B., Heijmans, B. T., Boomsma, D. I., ... Isaacs, A. (2018). A SNP panel for identification of DNA and RNA specimens. *BMC Genomics*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4482-7>

VIII. ANEXOS

Anexo 1 (Carta de aprovação Ética)

Comissão de Ética EGAS MONIZ



Proc. Interno nº 933

Ex.ma Senhora
Constança Palos

Monte de Caparica, 28 de janeiro de 2021.

Ex.ma Senhora,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado **"Associação dos polimorfismos genéticos IL-1 e do IL-1Ra com peri-implantite – estudo piloto"**, foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria Ferranda da Mesquita



EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica

Anexo 2 (Questionário)



Questionário _____

Data: __/__/__

Idade

Preencha com uma cruz (X) ou com a informação pedida.

Género

M

F

Gravidez

S

N

Amamentação

S

N

Pais e avós de origem caucasiana

S

N

Apresenta alguma doença imune ou inflamatória?

(Doenças genéticas, Doenças que afetem a mucosa oral e o tecido gengival, Doenças que afetem o tecido conjuntivo, Doenças endócrinas e metabólicas, Infecção por HIV, Diabetes mellitus, Artrite etc.)

S

N

Se sim qual? _____

História de Hepatite?

S

N

Se sim qual? _____

Tomou regularmente antibióticos ou anti-inflamatórios durante os últimos 6 meses?

Sim

Não

Se sim qual? _____



Hábitos Tabágicos

Sim

Não

Média de Cigarros por dia

Ex-fumador

Implantes dentários colocados

Clinica Universitária Egas Moniz

Outro local

Se noutro local indique há quanto tempo foi colocada a coroa sobre o implante _____

Anexo 3 (Consentimento Informado)



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.FE.17_03

Monte de Caparica, de de 2021

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do "Mestrado Integrado em Medicina Dentária" na Unidade Curricular de "Orientação Tutorial de Projeto Final" do(a) "Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM)", sob a orientação do(a) Mestre "José Maria Cardoso", solicita-se autorização para a participação no estudo "Associação dos polimorfismos dos genes da IL-1 e do IL-1Ra com a peri-implantite – estudo piloto" (integrado no estudo de doutoramento com o mesmo tema realizado pelo Mestre José Maria Cardoso) a "pacientes do programa de manutenção implantar do IUEM" com o objetivo de "avaliar a possível relação entre a existência de polimorfismos genéticos IL-1A^{*2}, IL-1B^{*2}, IL-1RN^{*2} e o desenvolvimento de peri-implantite", que consiste na seguinte participação: "A cada paciente será atribuído um questionário e caso concorde em participar no estudo e estejam de acordo com os critérios de inclusão, ser-lhes-á fornecido um consentimento informado para assinar. Como habitual nas consultas de manutenção periodontal, todos os candidatos serão submetidos a um exame de sondagem peri-implantar (6 localizações), avaliação do índice de placa e gengival (4 localizações), bem como da presença de hemorragia à sondagem e/ou supuração. Nos casos em que se verifique uma profundidade de sondagem superior a 6 mm será realizada uma radiografia de controlo do implante, através da técnica paralelométrica. Serão recolhidas da mucosa jugal, com o auxílio de um omniswab (Whatman FTA), células da mucosa oral. As amostras recolhidas serão utilizadas única e exclusivamente para este estudo e serão descartadas após a realização da análise em laboratório."

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios tais como "um melhor conhecimento acerca da patologia peri-implantar" ao progresso do conhecimento.



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.FE.17_03

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

