



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada
MESTRADO

Larissa Coelho Pires

**Reabsorção dentária radicular: envolvimento dos
polimorfismos de *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF***

**Maringá
2014**

Larissa Coelho Pires

**Reabsorção dentária radicular: envolvimento dos
polimorfismos de *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Mirian Marubayashi Hidalgo

Coorientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell

**Maringá
2014**

Larissa Coelho Pires

**Reabsorção dentária radicular: envolvimento dos polimorfismos de
*IL10, IL12, IL17 e TNF***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Dedico esta dissertação

A Deus, minha família
e orientadoras pelo apoio, força,
incentivo, companheirismo e amizade.
Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos primeiramente a **DEUS**, por me amparar e dar força para superar os momentos difíceis dessa vida, pois sem sua ajuda não chegaria até aqui, e não teria pessoas tão especiais ao meu redor, as quais foram peças fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, **Roseli e João Pires**, pelo amor e confiança incondicionais. Ao meu irmão, **Renan Pires**, por também estar sempre presente em minha vida. Vocês sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não em ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Amo vocês!

A meu querido esposo, **Tiago Lopes**, por ser tão importante na minha vida. Pelo amor, compreensão, paciência, apoio e amizade, durante esta caminhada e que foi fundamental para mais esta conquista.

Agradeço também aos meus sogros, **Terezinha e Valdir Lopes**, às minhas cunhadas e cunhados pelo incentivo e apoio que me deram. Obrigada pelo carinho!

Agradeço infinitamente à professora **Dra. Mirian M. Hidalgo**, minha orientadora, por esses dois anos de aprendizado, pela paciência, perseverança, amor e alegria em ensinar. Obrigada por compartilhar seu aprendizado, experiências e conhecimentos.

À professora **Ana Maria Sell**, minha coorientadora, por sempre estar disponível a ajudar, tirar minhas dúvidas, pela oportunidade de aprender a cada momento juntas.

À **Joana Zacarias**, não tenho palavras para agradecer!!! Pela infinita paciência, dedicação e disponibilidade para ficar no laboratório comigo e me acompanhar em toda a realização desta pesquisa, sua ajuda foi fundamental. Agradeço também à **Lays Chaves** e à **Vanessa Marques**, por toda a ajuda durante esta etapa.

A meus **amigos** do mestrado, pelos momentos divididos juntos. À todos os **professores** do departamento de Odontologia, pelos ensinamentos, orientações e amizade, que tanto me ajudaram a crescer. Vocês também foram referenciais para mim!

Finalmente, gostaria de agradecer aos professores que participaram da minha entrevista, durante o processo de seleção do mestrado, **Mitsue Fujimaki** e **Carlos Herrero**. Sem a aprovação e confiança de vocês este sonho não estaria se concretizando. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso e vice-Reitor, Prof. Dr. Julio César Damasceno;

À Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Pró-reitora, Prof^a. Dra. Célia Regina Granhen Tavares;

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Chefe, Prof. Dr. André Gasparetto e Chefe adjunto, Prof. Dr. Gustavo Jacobucci Farah;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, na pessoa da Coordenadora, Prof^a. Dra. Mitsue Fujimaki e coordenadora Adjunta Prof^a. Dra. Raquel Sano Suga Terada;

À CAPES, pelo apoio pecuniário.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Cada pessoa que passa em nossa vida,
Passa sozinha, é porque cada pessoa é única e
Nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que
Passa em nossa vida passa sozinha e não nos
Deixa só porque deixa um pouco de si e leva um
Pouquinho de nós. Essa é a mais bela
Responsabilidade da vida e a prova de que as
Pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

RESUMO

Objetivo: Verificar uma possível associação entre os polimorfismos de regiões promotoras dos genes *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* e reabsorção dentária radicular.

Métodos: Células mononucleares de sangue periférico de 24 pacientes que apresentaram reabsorção radicular externa resultante de movimentação dentária induzida com aparelhos fixos e de 23 indivíduos do grupo controle, que não realizaram tratamento ortodôntico e não apresentavam reabsorções dentárias, foram coletadas em estudo anterior e mantidas congeladas. O DNA foi extraído utilizando o método *salting out*. A genotipagem das regiões promotoras das citocinas foi realizada pela técnica PCR-SSP para *IL10*, *IL12* e *TNF*, empregando-se o método micro SSP-DNA, com kit Invitrogen™. Para *IL17*, foi utilizada a técnica PCR-RFLP. Para o cálculo do nível de significância foram utilizados os Testes Exato de Fisher, análises múltiplas ($p < 0,05$) e/ou Odds ratio, assim como foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg. **Resultados:** Foi encontrada associação entre polimorfismos da região promotora de *IL17* e *TNF* com reabsorção dentária ($p < 0,05$). Para *IL-17*, a maior frequência dos fenótipos predominantemente de baixa produção foram observados em pacientes, compatível com o relato em estudo anterior de diminuição do nível sérico nos pacientes com reabsorção radicular $< 1,5\text{mm}$. Verificou-se associação ($p < 0,05$) com a ocorrência de reabsorção radicular para *IL10* nas posições -819 e -592, *IL17A* e *TNF-308*, conforme alelos ou genótipos apresentados. **Conclusão:** Os resultados sugerem a associação entre os polimorfismos de regiões promotoras dos genes *IL10 -819, -592, IL17A* e *TNF -308* e reabsorção dentária radicular.

Palavras-chave: Reabsorção da raiz. Citocinas. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Aim: To investigate a possible association between the polymorphism of the promoter regions of *IL10*, *IL12*, *IL17*, and *TNF* with dental root resorption. *Methods:* Peripheral blood mononuclear cells from 24 patients with external root resorption resulting from induced tooth movement with fixed Orthodontics appliances and 23 control subjects who did not undergo orthodontic treatment and had no root resorption, were collected in a previous study and kept frozen. DNA was extracted using the Salting-out method. Genotyping of the promoter regions of cytokines was performed by PCR-SSP for *IL10*, *IL12* and *TNF*, using the DNA micro-SSP method, Invitrogen™ kit. For *IL17*, the PCR-RFLP technique was used. Tests as Fisher Exact, multiple analyzes ($p < 0.05$) and/or Odds ratio, as well as the Hardy-Weinberg equilibrium were calculated. *Results:* Association was found between polymorphisms in the promoter region of *TNF* and *IL17* with resorption ($p < 0.05$). For *IL-17*, the frequency of phenotypes predominantly of the low production is consistent with previous report of decreased serum levels in patients with root resorption < 1.5 mm. It was verified the association ($p < 0.05$) with occurrence of root resorption for *IL10* at positions -819 and -592, *IL17A*, and *TNF-308*, according to the alleles or genotypes presented. *Conclusion:* The results suggest an association between the polymorphisms of the promoter regions of *IL10 -819, -592, IL17A e TNF -308* genes with dental root resorption.

Key words: Root resorption. Cytokines. Polymorphism, genetic.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Haplótipos e fenótipos de produção das citocinas IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α nos pacientes com reabsorção dentária radicular e controles..	26
TABELA 2 - Frequências alélicas e genotípicas de <i>IL10</i> , <i>IL12</i> , <i>IL17</i> e <i>TNF</i> nos pacientes com reabsorção dentária radicular e controles	28
TABELA 3 - Fenótipos de produção e diferença do nível sérico de IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α , segundo reabsorção radicular encontrada	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM - Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ - Temperatura em graus Celsius

A - Adenosina

C – Citosina

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CMSP - Células Mononucleares de Sangue periférico

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

dNTP – Desoxinucleotídeos trifosfatados

D O – Densidade óptica

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

G - Guanina

IgA - Imunoglobulina A

IgAs - IgA secretora

IgG - Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 α - Interleucina 1 alfa

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL10 - Gene da Interleucina 10

IL-10 - Interleucina 10

IL12 - Gene da Interleucina 12

IL-12 - Interleucina 12

IL17 - Gene da Interleucina 17

IL-17 - Interleucina 17

mA - Miliampere

MEC - Matriz extracelular

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

Min - Minutos

mM- Milimolar

mm - Milímetros

NaCl - Cloreto de sódio

ng – Nanograma

nm - Nanômetro

PCR-RFLP - *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*

PCR-SSP - *Polymerase Chain Reaction – Sequence-Specific Primers*

RCBL - *Red Cell Blood Lysis*

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m - RNA Mensageiro

SDS - Sulfato dodecil de sódio

SNPs - Polimorfismo de nucleotideo simples

T - Timina

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

TNF - Gene do Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UEL - Universidade Estadual de Londrina

UEM - Universidade Estadual de Maringá

V - Volts

W - Watts

μ L - Microlitro

SUMÁRIO

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	14
	Referências	18
2.	ARTIGO	20
3.	INTRODUÇÃO	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Delineamento experimental.....	22
4.2	Casuística.....	22
4.3	Extração de DNA.....	23
4.4	Genotipagem de regiões promotoras dos genes das citocinas.....	24
4.5	Análise estatística.....	24
5.	RESULTADOS	25
6.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	34
	ANEXOS	37

1 - CONTEXTUALIZAÇÃO

Este trabalho é decorrência de inquietações e reflexões que levaram os integrantes do grupo de pesquisa a iniciar os estudos sobre as reabsorções dentárias, em 1997. Uma tese de doutoramento foi realizada (HIDALGO, 2001) e verificou-se o potencial imunogênico da dentina e o envolvimento imunopatológico na etiopatogenia das reabsorções dentárias. Foi possível traçar um perfil sorológico próprio e identificador do processo reabsortivo, se por substituição ou inflamatório, antes mesmo da manifestação clínica e/ou radiográfica (CONSOLARO; HIDALGO, 2002, 2012; HIDALGO; ITANO; CONSOLARO, 2005). Um estudo subsequente corroborou os dados encontrados, demonstrando igualmente que os perfis séricos de IgG e IgM específicas ao extrato dentinário humano ou suas frações, permitiam identificar o processo de reabsorção dentária em pacientes submetidos a movimentação dentária induzida (SANCHEZ et al., 2003).

Em 2011, Ramos e colaboradores sugeriram que podem ocorrer variações na resposta imune sistêmica e local aos antígenos dentinários durante o tratamento ortodôntico, destacando que a detecção de altos níveis de IgA secretora (IgAs) pré-tratamento foi associada com lesões reabsortivas mais avançadas, após seis meses de tratamento. Costa e colaboradores (2014), sugeriram que frações antigênicas são liberadas pela dentina, apresentadas ao sistema imune, possibilitando a detecção de altos níveis de IgG salivar em pacientes submetidos à Ortodontia, mesmo que decorridos anos após a finalização do tratamento.

Além dos perfis sérico e salivar de anticorpos específicos contra dentina/frações encontrados em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, também foram estudados e caracterizados os efeitos de extratos de dentina na produção de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico em ratos, demonstrando que a dentina induz a produção de citocinas inflamatórias e sugerindo que vias pró-reabsortivas podem ser estimuladas quando moléculas dentinárias entram em contato com as células ósseas durante os processos patológicos associados com a dissolução da matriz óssea e dentária (SILVA et al., 2004). Lima (2013) avaliou se o tratamento ortodôntico induz alterações nos níveis sistêmicos de citocinas e a possível correlação com reabsorção dentária apical. Verificou que não há impacto

sobre IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α séricos, mas houve modulação de IL-10, IL-12 e IL-17, de acordo com o grau de reabsorção dentária apical e período de tratamento. No entanto, advertiu que os dados não foram consistentes em todos os períodos avaliados e sugeriu estudos adicionais.

Quando os dentes sofrem agressão de qualquer natureza (trauma, alterações pulpares, tratamento ortodôntico, entre outros), gera-se um processo inflamatório e na presença de uma concentração mais elevada de mediadores inflamatórios tanto locais como sistêmicos, os osteoblastos podem promover processos de osteorremodelação sobre a raiz em uma modulação positiva ou negativa, que por sua vez podem resultar em reabsorções (CONSOLARO, 2011, 2012; MAMATA et al., 2013). Concomitantemente, durante a reabsorção dentária pode ocorrer a ativação da imunidade inata e da resposta imune por proteínas da matriz dentinária (CONSOLARO; HIDALGO, 2002, 2012; COSTA et al., 2014; HIDALGO; ITANO; CONSOLARO, 2005; LIMA, 2013; RAMOS et al., 2011; SANCHEZ et al., 2003; SILVA et al., 2004). Há migração celular dos vasos sanguíneos em direção aos locais de inflamação através da matriz extracelular (MEC). Este movimento é regulado por mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e enzimas que degradam a MEC (SILVA et al., 2004).

As citocinas são proteínas produzidas e secretadas por diferentes células durante a ativação do sistema imunológico. Atuam como sinais entre as células, agindo localmente ou apresentando ação sistêmica com diversificadas funções, como mediação de respostas imunes e inflamatórias, síntese de RNAm, entre outros (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2012). Algumas podem ser consideradas como inflamatórias, como a IL-12, IL-17 e TNF- α ; outras podem ser responsáveis por imunossupressão, como a IL-10 (VARELLA; FORTE, 2001).

O envolvimento de citocinas na reabsorção radicular foi demonstrado em modelos animais e humanos (BASARAN et al., 2006; CONSOLARO, 2012; LIMA, 2013; MacLINE; RABIE; WONG, 2010; SHETTY; KUMAR; SMITHA, 2011; ZHANG et al., 2003). O limite entre a movimentação dentária induzida, por exemplo, na qual citocinas e hormônios desempenham um papel importante para se alcançar o resultado esperado por meio da reabsorção/neoformação óssea e o desencadeamento de uma reabsorção radicular é muito tênue (MacLINE; RABIE; WONG, 2010; SHETTY; KUMAR; SMITHA, 2011).

As citocinas frequentemente correlacionadas com os processos de osteorremodelação e reabsorções dentárias são IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α (CONSOLARO, 2012; MacLINE; RABIE; WONG, 2010; SHETTY; KUMAR; SMITHA, 2011; VARELLA; FORTE, 2001; ZHANG et al., 2003). No entanto, Mamata e colaboradores (2013) afirmam que somente a IL-1 α tem uma potente capacidade de estimular a reabsorção dentária radicular. Lima (2013) observou que no soro de pacientes com reabsorção inflamatória decorrente de doze meses de movimentação dentária induzida havia aumento de IL-10 para pacientes apresentando $\geq 1,5$ mm de reabsorção e diminuição de IL-12 e IL-17, respectivamente para reabsorção $\geq 1,5$ mm e $< 1,5$ mm.

Com acesso ao material utilizado na pesquisa de Lima (2013), utilizou-se tal marco teórico para formular a hipótese que existe associação entre o polimorfismo de regiões promotoras dos genes *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* com reabsorção dentária radicular.

Diversas enfermidades foram atualmente associadas aos polimorfismos das regiões promotoras das citocinas IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α (CARVALHO et al., 2012; KAABACHI et al., 2014; KADKHODAZADEH et al., 2013; LIANG et al., 2014; MANJARI et al., 2014; RAFIEI et al., 2013; WANG et al., 2014). A região promotora de um gene é uma sequência especial de nucleotídeos que indica o ponto inicial para a síntese de RNA, ou seja, o local onde se iniciará a transcrição, a regulação da síntese de proteínas e a expressão do gene. Se ocorrer a variação de um gene na sequência de nucleotídeos em um alelo, seja por transcrição ou substituição, estaremos frente a um polimorfismo (ALBERTS; BRAY; LEWIS, 2008). Nas regiões codificadoras de proteínas há menor possibilidade de ocorrência de mutação do que qualquer outro segmento do DNA humano (NUSSBAUM; McINNIS; WILLARD, 2008). Quando encontra-se um alelo variante com uma frequência relativamente elevada na população ($>1\%$), diz-se que ele apresenta um polimorfismo genético. Quando essa alteração é muito rara e pouco presente nos indivíduos, denomina-se de mutação (GUZMAN et al., 2003; KINANE; HART, 2003).

O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) parece estar associado com uma produção diferenciada de citocinas. Genótipos particulares de citocinas podem influenciar diretamente na patogênese da doença, pois afetam a síntese desses mediadores inflamatórios que determinam o fenótipo encontrado (BARROS, 2006).

Ante o exposto, a expertise do grupo de pesquisa, a escassez de dados disponíveis na literatura e a contribuição para a melhor compreensão dos fatores que podem participar nos mecanismos de ocorrência da reabsorção radicular inflamatória externa justificaram a realização deste trabalho, com o uso do material anteriormente coletado (LIMA, 2013). A pesquisa assumiu um caráter interinstitucional ao envolver a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a Universidade Estadual de Londrina (UEL), permitindo a continuidade e maior consistência da linha de pesquisa comum aos docentes participantes e, em especial, convergindo na elaboração de uma dissertação, a partir das linhas de pesquisa já consolidadas individualmente pelas orientadoras e reforçando o caráter multidisciplinar.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILAI, S. Citocinas. In: _____ **Cellular and molecular immunology**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2012.
2. ALBERTS, B.; BRAY D.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2008.
3. BAŞARAN G. et al. Interleukine-1 β and Tumor Necrosis Factor- α levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment. **The Angle Orthodontist**, v. 76, n. 5, p. 830-836, Sept. 2006.
4. BARROS, F.C.; FIGUEREDO, C.M.S.; FISHER, R.G. Polimorfismo de citocinas relacionadas ao processo inflamatório periodontal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 171-180, Maio/Ago. 2006.
5. CARVALHO, V.C.V. et al. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p. 7627–7634. July. 2012.
6. CONSOLARO, A. O conceito de reabsorções dentárias ou as reabsorções dentárias não são multifatoriais, nem complexas, controversas ou polêmicas. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 16, n. 4, p.19-24, Jul./Ago. 2011.
7. CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 3. ed.** Maringá: Dental Press, 2012.
8. CONSOLARO, A; HIDALGO, M.M. As reabsorções dentárias têm natureza imunopatológica, pelas evidências de autoimunidade. In: CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. Maringá: Dental Press, 2002. p.69-86.
9. CONSOLARO, A; HIDALGO, M.M. As reabsorções dentárias têm natureza imunopatológica, pelas evidências de autoimunidade. In: CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 3. ed.** Maringá: Dental Press, 2012. p.199-222.
10. COSTA, T.M.P.S. et al. Detection of dentin antigen fractions by salivary immunoglobulin G in patients undergoing orthodontic treatment. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 22, p. 2282-2287, May 2014.
11. GUZMAN, S. et al. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. **Journal of Periodontology**, v.74, n.8, p.1183-1190, Aug. 2003.
12. HIDALGO, M.M. **Estudo sobre o potencial imunogênico da dentina: Contribuição para a citopatia da reabsorção dentária**. 2001. 104 f. Tese (Doutorado em Patologia bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2001. [Orientador: Prof. Alberto Consolaro].
13. HIDALGO, M.M.; ITANO, E.N.; CONSOLARO, A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. **Dental Traumatology**, v. 21, n. 4, p. 218-221, Aug. 2005.
14. KAABACHI, W. et al. Interleukin-17A and -17F genes polymorphisms in lung cancer. **Cytokine**, v. 66, n. 1, p. 23–29. Mar. 2014.
15. KADKHODAZADEH, M. et al. IL-17 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis and peri-implantitis in Iranian patients: a cross-sectional study. **Immunology Investigations**, v. 42, n. 2, p.156–163, Feb. 2013.

16. KINANE, D.F.; HART, T.C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v.14, n.6, p.430-449, 2003.
17. LIANG, B.; GUO, Y.; LI, Y.; KONG, H. Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88448, Feb. 2014.
18. LIMA, C.E.O. **Níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNF α e de IgG/IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013. [Orientadora: Profa. Eiko Nakagawa].
19. MacLINE, J.K; RABIE, A.B.M.; WONG, R. Does orthodontic tooth movement cause an elevation in systemic inflammatory markers? **The European Journal of Orthodontics**, v. 32, n. 4, p. 435-440, Aug. 2010.
20. MAMATA, K. et al. An insight into the regulatory mechanisms of cells involved in resorption of dental hard tissues. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 17, n. 2, p. 228–233, May/Aug. 2013.
21. MANJARI, K. S et al. A single nucleotide polymorphism in Tumor Necrosis Factor- α (-308 G/A) as a biomarker in chronic pancreatitis. **Gene**, v. 539, n. 2, p. 186-189, Apr. 2014.
22. NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
23. RAFIEI, A. et al. Polymorphism in the interleukin-17A promoter contributes to gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 34, p. 5693-5699, Sept. 2013.
24. RAMOS, S.P. et al. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. **The European Journal of Orthodontics**, v. 33, n. 5, p. 584-591, Feb. 2011.
25. SANCHEZ, L.I.T. et al. Perfil sérico de IgG e IgM em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico: contribuição para a etiopatogenia da reabsorção dentária. **Revista Dental Press Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 8, n. 6, p. 13-21, Nov./Dez. 2003.
26. SHETTY, S.K.; KUMAR, Y. M.; SMITHA, P.L. Cytokines and orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Sciences and Research**, v. 2, n. 1, p. 132-141, Feb. 2011.
27. SILVA, T.A. et al. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. **Oral Diseases**, v. 10, n. 5, p. 258-264, Sept. 2004.
28. VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, Ago. 2001.
29. ZHANG, D. et al. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 3, p.324-332, June. 2003.
30. WANG, S. et al. IL-17F but not IL-17A gene polymorphism confers risk to multiple sclerosis in a Chinese Han population. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 342, n. 1-2, p. 133–136. July. 2014.

2 - ARTIGO

REABSORÇÃO DENTÁRIA RADICULAR: ENVOLVIMENTO DOS POLIMORFISMOS DE *IL10*, *IL12*, *IL17* E *TNF*

Larissa Coelho Pires¹, Joana Máira Valentini Zacarias², Ana Maria Sell², Carlos Eduardo de Oliveira Lima³, Eiko Nakagawa Itano⁴, Mirian Marubayashi Hidalgo¹

DENTAL ROOT RESORPTION: INVOLVEMENT OF *IL10*, *IL12*, *IL17* and *TNF* POLYMORPHISMS

Running title: *IL10*, *IL12*, *IL17* and *TNF* polymorphisms and dental root resorption

¹ Department of Dentistry, Postgraduate Program in Interdisciplinary Dentistry,

² Department of Health Basic Sciences, Postgraduate Program in Bioscience applied to Pharmacy, State

² Department of Health Basic Sciences, Postgraduate Program in Bioscience applied to Pharmacy, State University of Maringá;

³ Department of Oral Medicine and Children Dentistry,

⁴ Department of Pathological Science, Postgraduate Program in Experimental Pathology, State University of Londrina; Brasil.

3 - INTRODUÇÃO

As reabsorções radiculares inflamatórias podem decorrer de agressões de qualquer natureza (trauma, alterações pulpares, tratamento ortodôntico, entre outros) sofridas pelos dentes e que gerem um processo inflamatório (1, 2). São consideradas como achados clínicos importantes para Odontologia, na medida em que há descrição, por exemplo, que 90 a 100% dos indivíduos que utilizam aparelhos ortodônticos fixos as apresentam, sendo categorizadas como reabsorção grave ou severa e estruturalmente importante em 10% dos dentes submetidos à Ortodontia (1, 3).

A participação da imunidade inata e da resposta imune específica nas reabsorções dentárias foram demonstradas (4-10), com a migração celular dos vasos sanguíneos em direção aos locais de inflamação através da matriz extracelular (MEC), sob regulação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e enzimas que degradam a MEC e que atuam tanto no local e/ou sistemicamente com sobreposição de funções, exercendo seus efeitos indutores e/ou inibidores (7, 11-16).

O limite entre a ação esperada da movimentação dentária induzida, por exemplo, na qual citocinas e hormônios desempenham um papel importante, e o desencadeamento de uma reabsorção radicular é muito tênue (7, 11). As citocinas frequentemente correlacionadas com os processos de osteorremodelação e reabsorções dentárias são IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α (1, 7, 11, 16). No entanto, Mamata e colaboradores (2) afirmaram que somente a IL-1 α tem uma potente capacidade de estimular a reabsorção dentária radicular. Em 2013, Lima (4) observou que no soro de pacientes com reabsorção inflamatória decorrente de doze meses de movimentação dentária induzida havia aumento de IL-10 para pacientes apresentando reabsorção $\geq 1,5$ mm e diminuição de IL-12 e IL-17, respectivamente para reabsorção $\geq 1,5$ mm e $< 1,5$ mm. A partir desse marco teórico, formulou-se a hipótese que existe associação entre o polimorfismo de regiões promotoras dos genes *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* e reabsorção dentária radicular.

Diversas associações entre enfermidades e polimorfismos das regiões promotoras das citocinas IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α foram descritas (17-24). O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) nas regiões promotoras está associado com fenótipos de produção diferenciada de citocinas e assim influenciar diretamente na patogênese da doença (18, 24). De nosso conhecimento, não há estudos correlacionando polimorfismos de regiões promotoras de citocinas com reabsorções dentárias.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi verificar uma possível associação entre os polimorfismos de regiões promotoras dos genes *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* e a reabsorção dentária radicular.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Delineamento experimental

As variáveis utilizadas para avaliar a associação entre os genes envolvidos na resposta imune e a reabsorção dentária radicular foram o polimorfismo das regiões promotoras dos genes *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* em pacientes com reabsorção e controles sem reabsorção. A extensão da reabsorção radicular, mensurada em <1,5 mm ou \geq 1,5 mm e os níveis séricos dessas citocinas apresentados em densidade óptica (D.O.) dos pacientes com reabsorção foram definidos previamente (4).

4.2 - Casuística

O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEM, CAAE: 20657413.6.0000.0104. Foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (CMSP) congeladas, advindas de 24 pacientes que apresentaram reabsorção radicular externa resultante de movimentação dentária induzida com aparelhos fixos para correção de

maloclusões Classes I ou II e 23 indivíduos do grupo controle, os quais não realizaram tratamento ortodôntico e não apresentavam reabsorções dentárias, sendo todas as amostras coletadas em estudo anterior (4). Do trabalho de Lima (4), foram utilizados os dados referentes à concentração sérica das citocinas IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α antes do início da movimentação ortodôntica (T0) e após 12/13 meses de tratamento (T2), obtidas por meio do teste ELISA e, da extensão da reabsorção radicular mensurada em radiografias periapicais dos incisivos centrais superiores esquerdo e direito pelo método da Subtração Radiográfica Digital, no grupo de pacientes, e que foi subdividida em $<1,5\text{mm}$ e $\geq 1,5\text{mm}$.

4.3 - Extração do DNA

O DNA foi extraído das PBMCs congeladas utilizando-se o método *salting out*, adaptado por Cardozo e colaboradores (25). Resumidamente, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e lavadas com tampão *Red Cell Blood Lysis* (RCBL). Adicionou-se proteinase K, sulfato dodecil de sódio (SDS, Sigma Chemical CO, Steinheim, Germany) e água de injeção para a ruptura das proteínas; cloreto de sódio (NaCl) para eliminar as impurezas; e, álcool absoluto e álcool 70% para a precipitação do DNA. Em seguida, foi re-hidratado com 50 μL de água de injeção. A avaliação da concentração e da pureza foram realizadas pelo aparelho NanoDrop 2000® (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e o DNA obtido foi mantido sob refrigeração a -4°C, para posterior amplificação.

4.4 - Genotipagem de regiões promotoras dos genes das citocinas

A genotipagem das regiões promotoras de *IL10* -1082 (rs1800872), -819 (rs1800871) e -592 (rs1800896), *IL12* -1188 (rs3212227) e *TNF* -308 (rs1800629) foram realizadas pela técnica PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence-Specific Primers*), descrita por NEWTON e colaboradores (26), empregando-se o

método micro SSP-DNA (*Cytokine Genotyping Kit*, Ref. 7892010, Invitrogen™, Termo Fisher Scientific Inc, USA) segundo recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram ajustadas na concentração de 60-80 ng/μL. A amplificação ocorreu em um termociclador Thermal cycler GeneAmp® System 9700 (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific Inc, USA). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em cuba *micro SSP gel System* (MGS-B, One Lambda Inc. Canoga Park, USA) em gel de agarose a 2%, a 90 V, 300 mA, 140 W por 17 min. A visualização das bandas foi realizada pela coloração com Sybr® Green (Termo Fisher Scientific Inc, USA) e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência de fragmentos específicos do DNA amplificado e documentados em fotografias.

A genotipagem da região promotora de *IL17A* (rs2275913) foi realizada pela técnica PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), seguindo o protocolo de Corrêa e colaboradores (23), com algumas modificações. Para a amplificação, utilizou-se tampão para PCR, 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados), 10 μM de cada *primer*, 0,3 μL *Taq DNA Polymerase* e 3 μL DNA a 50 ng/μL em um volume total de 30 μL. O produto amplificado foi misturado com a enzima *XagI* (EcoNI - Thermo Fisher Scientific Inc, USA), volume a volume e foi incubado por 12 h à 37°C. Os fragmentos de DNA digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3,5%, a 70 V por 10 min; 90 V por 20 min, em 300 mA, 140 W. A revelação das bandas foi realizada pela coloração de Sybr® Green (Termo Fisher Scientific Inc, USA) e exposição à luz ultravioleta. A interpretação dos resultados foi realizada pela visualização de fragmentos de DNA digeridos com pesos moleculares de 102 pares de base (pb), 68pb e 34pb e documentados em fotografias.

4.5 - Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel e o cálculo das frequências foi realizado pelo programa estatístico SNPStats

(<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats>) para *IL10* e por contagem direta para os demais genes. As diferenças estatísticas entre pacientes e controles para as frequências dos alelos, haplótipos e fenótipos relativos foram calculadas pelo Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$), sendo utilizado o *software* GraphPad. Para o cálculo do Odds Ratio, foi utilizado o programa estatístico SISA (<http://distributionswww.quantitativeskills.com/sisa/htm>). O programa estatístico SNPStats também foi utilizado para o Teste de Análises múltiplas e o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5 - RESULTADOS

A distribuição das frequências alélicas para as regiões promotoras dos genes das citocinas analisadas estavam em conformidade com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos controle e teste.

Deve ser mencionado que não se obteve a genotipagem de todas as citocinas para a totalidade da amostra, ainda que os experimentos tivessem sido repetidos até o término do material coletado. Para *IL10*, faltaram um paciente e três controles; para *IL12*, um paciente e quatro controles; e, para *TNF*, um paciente e dois controles.

A Tabela 1 apresenta os haplótipos e respectivos fenótipos de produção das citocinas analisadas nos pacientes e controles. Os fenótipos de produção das citocinas foram descritos conforme publicação anterior por Yilmaz e colaboradores (27); Reichert e colaboradores (28); Espinoza e colaboradores (29); e Wilson e colaboradores (24). Seis diferentes combinações para *IL10* foram apresentadas a partir da amostra de 43 indivíduos. Os haplótipos mais frequentes para os casos e controles foram, respectivamente, 41% e 28% GCC, 34% e 22% ACC e 17% e 42% ATA. Os pacientes apresentaram uma maior frequência de genótipo para alto produtor de IL-10 e os controles apresentaram maior frequência de baixo produtor, porém sem diferença significativa. Para IL-12, as frequências dos haplótipos dos casos e controles foram semelhantes, variando entre 84% e 87% para baixa produção e entre 13% e 16% para alta. Para IL-17, 68% dos pacientes possuem

fenótipo de baixa produção e 61% dos controles apresentaram alta produção, com diferença estatística entre os grupos ($p=0,04$). Para TNF- α foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências de casos e controles ($p=0,0420$), sendo que o fenótipo de alta produção foi menos frequente em pacientes (4%) do que nos controles (29%).

Tabela 1. Haplótipos e fenótipos de produção das citocinas IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α nos pacientes com reabsorção dentária radicular e controles.

Genes das citocinas	Haplótipos	Fenótipos relativos de produção de citocinas	Pacientes n (%)	Controles n (%)	p-valor ⁶
<i>IL10</i>¹					
	GCC	alta	9 (41)	6 (28)	ns ⁷
	ACC	intermediária	8 (34)	4 (22)	ns
	ATA	baixa	4 (17)	8 (42)	ns
	GCA	- ⁵	0	1 (5)	ns
	ATC	- ⁵	1 (3)	1 (3)	ns
	ACA	- ⁵	1 (5)	0	ns
<i>IL12</i>²					
	CC	alta	3 (13)	3 (16)	ns
	AA ou CA	baixa	20 (87)	16 (84)	ns
<i>IL17</i>³					
	GA ou AA	alta	7 (32)	14 (61)	0,04 ⁸
	GG	baixa	17 (68)	9 (39)	
<i>TNF</i>⁴					
	GA ou AA	alta	1 (4)	6 (29)	0,04 ⁹
	GG	baixa	22 (96)	15 (71)	

De acordo com: ¹Yilmaz et al, 2005; ²Reichert et al., 2008; ³Espinoza et al., 2011; ⁴Wilson et al., 1997. ⁵Sem referência na literatura. ⁶ $p<0,05$. Teste Exato de Fisher. ⁷Não significativa. ⁸OR=0,26. IC (0,079-0,892). ⁹OR=0,11. IC (0,012 – 1,043).

Para *IL10*, diferença estatisticamente significativa foi observada entre as frequências dos alelos C e T ($p=0,01$) na posição -819 entre os grupos de pacientes e controles (Tabela 2). A presença do alelo C foi associada à maior susceptibilidade à reabsorção radicular e o alelo T apresenta-se como um fator de resistência para esta alteração ($p=0,01$; OR=3,36; IC=1,29-8,77). Os indivíduos que apresentem o alelo C no genótipo apresentam 3,36 vezes mais chances de desenvolver a reabsorção radicular do que aqueles que possuem o alelo T. Os indivíduos que apresentam um genótipo homocigoto TT possuem menor risco do desenvolvimento

de reabsorção radicular ($p=0,03$; $OR=0,10$; $IC=0,01-0,97$). Na posição -592, também observou-se diferença significativa na frequência do alelo C ($p=0,02$; $OR=3,25$; $IC:1,27-8,30$), sendo que sua presença representa 3,25 vezes maior susceptibilidade para a ocorrência de reabsorção radicular, e a presença de um genótipo homozigoto AA resulta em um fator de proteção para a reabsorção radicular ($p=0,03$; $OR=0,10$; $IC=0,01-0,97$).

As frequências alélicas e genótípicas da *IL12* não apresentaram diferença significativa quando comparados os pacientes e controles.

Para *IL17*, houve diferença estatisticamente significativa nas frequências dos alelos A e G ($p=0,02$; $OR=3,21$; $IC=1,22-8,41$) e genótipo GG ($p=0,04$; $OR=3,77$; $IC=1,12-12,73$). O alelo G foi associado à maior susceptibilidade de ocorrência de reabsorção radicular, aproximadamente, 3 vezes mais risco que aqueles com o alelo A. Foi verificado ainda que, apenas na presença de um genótipo homozigoto GG este risco permanece; pois, quando existe a presença do alelo A, a susceptibilidade para a reabsorção radicular diminui.

Para *TNF*, a presença de um genótipo homozigoto GG torna o indivíduo 8,8 vezes mais susceptível a desenvolver reabsorção radicular ($p=0,04$; $OR=8,8$; $IC=0,95-80,73$).

Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas de *IL10*, *IL12*, *IL17* e *TNF* nos pacientes com reabsorção dentária radicular e controles.

Genótipo Alelos	Pacientes n (%)	Controles n (%)	Odds Ratio (95% IC ¹)	p-valor ²
<i>IL10-1082</i>				
A	27 (58)	27 (67)		ns
G	19 (42)	13 (33)		ns
AA	8 (35)	9 (45)		ns ³
GA	11 (48)	9 (45)		ns
GG	4 (17)	2 (10)		ns
<i>IL10-819</i>				
C	37 (80)	22 (55)	3,36 (1,29-8,77)	0,01
T	9 (20)	18 (45)		
CC	15 (65)	8 (40)		ns
CT	7 (30)	6 (30)		ns
TT	1 (5)	6 (30)	0,10 (0,01-0,97)	0,03
<i>IL10-592</i>				
C	36 (78)	21 (52)	3,25 (1,27-8,30)	0,02
A	10 (22)	19 (48)		
CC	14 (61)	7 (35)		ns
CA	8 (35)	7 (35)		ns
AA	1 (4)	6 (30)	0,10 (0,01-0,97)	0,03
<i>IL12-1188</i>				
A	34 (74)	25 (66)		ns
C	12 (26)	13 (34)		ns
AA	14 (61)	9 (47)		ns
CA	6 (26)	7 (37)		ns
CC	3 (13)	3 (16)		ns
<i>IL17F</i>				
G	40 (83)	28 (61)	3,21 (1,22-8,41)	0,02
A	8 (17)	18 (39)		
GG	17 (71)	9 (39)	3,77 (1,12-12,73)	0,04
AG	6 (25)	10 (43)		ns
AA	1 (4)	4 (18)		ns
<i>TNF-308</i>				
G	45 (98)	36 (86)		ns
A	1 (2)	6 (14)		ns
GG	22 (96)	15 (71)	8,8 (0,95-80,73)	0,04
GA	1 (4)	6 (29)		ns
AA	0	0		-

¹IC= Intervalo de Confiança. ²p<0,05. Teste Exato de Fisher. ³Valor da probabilidade nos indivíduos que não apresentavam o genótipo em homozigose foram calculados somando os valores de XY + YY.

Os fenótipos relativos de produção de IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α obtidos a partir dos genótipos, somados ao grau de reabsorção radicular e os níveis séricos dessas citocinas descritos anteriormente por LIMA (4), para o grupo de pacientes com reabsorção estão explicitados na Tabela 4. No grupo com reabsorção $\geq 1,5$ mm foi descrito um aumento de IL-10 e diminuição de IL-12 séricas após 12/13 meses de tratamento; estas alterações não foram correlacionadas aos fenótipos relativos encontrados. Para o grupo com reabsorção $< 1,5$ mm, Lima (4) relata redução na concentração sérica de IL-17 após o tratamento, em consonância com os fenótipos relativos de produção encontrados, todos de baixa produção exceto um deles. Não houve relato de diferença no nível sérico de TNF- α (4).

Tabela 3. Fenótipos relativos de produção e diferenças do nível sérico de IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- α , segundo reabsorção radicular encontrada.

Pacientes	IL-10			IL-12		IL-17		TNF- α	
	Reabsorção radicular ^{1,2} (T2-T0) ³	Nível sérico ⁴ (T2-T0) ³	Fenótipo relativo de produção ⁵	Nível sérico ⁴ (T2-T0) ³	Fenótipo relativo de produção ⁶	Nível sérico ⁴ (T2-T0) ³	Fenótipo relativo de produção ⁷	Nível sérico ⁴ (T2-T0) ³	Fenótipo relativo de produção ⁸
1	< 1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
2	< 1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
3	< 1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa	Aumentado	Baixa	Aumentado	Baixa
4	< 1,5	Aumentado	Alta	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Aumentado	Baixa
5	<1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
6	< 1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Aumentado	Baixa
7	< 1,5	Aumentado	Alta	Diminuído	Baixa	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa
8	< 1,5	Diminuído	Alta	Diminuído	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
9	< 1,5	Aumentado	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Inalterado	Baixa
10	< 1,5	Aumentado	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Alta
11	< 1,5	Aumentado	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
12	$\geq 1,5$	Diminuído	Alta	Aumentado	Baixa	Aumentado	Baixa	Aumentado	Baixa
13	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Aumentado	Baixa	Aumentado	Alta	Aumentado	Baixa
14	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Diminuído	Alta	Aumentado	Baixa	Aumentado	Baixa
15	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Diminuído	Intermediária	Diminuído	Alta	Aumentado	Baixa
16	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Diminuído	Baixa	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa
17	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Diminuído	Alta	Diminuído	Baixa	Aumentado	Baixa
18	$\geq 1,5$	Aumentado	Alta	Diminuído	Baixa	Inalterado	Alta	Diminuído	Baixa
19	$\geq 1,5$	Aumentado	Intermediária	Diminuído	Intermediária	Inalterado	Alta	Diminuído	Baixa
20	$\geq 1,5$	Diminuído	Intermediária	Diminuído	Intermediária	Inalterado	Alta	Aumentado	Baixa
21	$\geq 1,5$	Aumentado	Intermediária	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
22	$\geq 1,5$	Aumentado	Intermediária	Aumentado	Baixa	Inalterado	Baixa	Aumentado	Baixa
23	$\geq 1,5$	Aumentado	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa	Diminuído	Baixa
24	$\geq 1,5$	Aumentado	NA ⁹	Diminuído	NA ⁹	Inalterado	Baixa	Diminuído	NA ⁹

¹Reabsorção radicular e dosagem das citocinas descritas por Lima, 2013. ²Em mm. ³Diferença entre as leituras aos 12/13 meses de tratamento ortodôntico (T2) e pré-tratamento (T0).

⁴Leituras apresentadas em densidade óptica a 492nm. De acordo com: ⁵Yilmaz et al, 2005; ⁶Reichert et al., 2008; ⁷Espinoza et al., 2011; ⁸Wilson et al., 1997; ⁹Não analisado.

6 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo foi feito a partir de uma população escolhida e não de uma amostra populacional, mas, ainda assim foi verificado que a distribuição das frequências alélicas para as regiões promotoras dos genes das citocinas analisados estavam em conformidade com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, que demonstra uma distribuição aleatória da população.

Neste estudo, ao avaliar o genótipo dos pacientes foi encontrada associação entre polimorfismos da região promotora de *IL10*, *IL17* e *TNF* e reabsorção dentária. Somente para *IL-17* os fenótipos relativos de baixa produção encontrados foram compatíveis com o relato de diminuição do nível sérico nos pacientes com reabsorção radicular <1,5mm (4).

O envolvimento de *IL-10*, *IL-12*, *IL-17* e *TNF- α* na formação e função dos osteoclastos e na reabsorção óssea e dentária foi anteriormente estabelecido (7, 11, 12, 16, 30-33), porém, no nosso trabalho não encontramos correlação entre o genótipo do paciente com a produção sérica do mesmo, com exceção da *IL-17*. Portanto essa modulação, positiva ou negativa, deve estar relacionada predominantemente com fatores locais (1, 33).

A maior frequência de fenótipos de baixa produção de *IL-10* foi observada no grupo controle e de alta produção no grupo de pacientes, porém sem diferença significativa. A *IL-10* é caracterizada como uma citocina inibitória (30) e quando se apresenta em baixa produção pode agir como um fator estimulador para osteoclastogênese (28, 31) e susceptibilidade à reabsorção radicular. Lima (4) encontrou aumento do nível sérico da *IL-10* nos pacientes com reabsorção radicular $\geq 1,5$ mm, diferente do que diz a literatura. Não encontramos relação com genótipo e produção sérica para esta citocina, apenas a presença de alguns alelos representaram maior ou menor susceptibilidade. Pode ser destacada que a presença do alelo C, tanto na posição -819 como na posição -592, representa três vezes mais chance de desenvolver a reabsorção radicular do que aqueles que possuem os alelos T ou A, respectivamente, naquelas posições.

Diferença estatística significativa entre os grupos com reabsorção e controles foi encontrada para *IL17*, sendo que cerca de 70% possuíam fenótipo de baixa produção, estando de acordo a descrição anterior de redução sérica para esta citocina (4), e 60% de alta produção, respectivamente; e, para *TNF*, 96% de baixa produção e 29% de alta produção, respectivamente. IL-17 e TNF- α são considerados como potentes estimuladores da reabsorção óssea (30, 33), podendo então correlacionarmos estas citocinas com a reabsorção radicular. Foi descrito que o sinergismo da IL-12 com TNF- α gera a inibição da osteoclastogênese (32). Sugere-se que a diminuição de IL-12 sérica relatada por Lima (4) pode não ter sido capaz de inibir a ação de TNF- α . Assim, mesmo nos pacientes apresentando fenótipos de baixos produtores de IL-17 e TNF- α aqui demonstrados e com diminuição do nível sérico de IL-17 relatado por Lima (4), observou-se a ocorrência de reabsorção radicular. Ao se vincular o gene *IL17* e a citocina IL-17 e sendo essa citocina relacionada à auto-imunidade (31), reforçamos o envolvimento desta citocina e o caráter imunopatológico das reabsorções dentárias radiculares como demonstrado por nosso grupo de pesquisa (5, 6, 8). Houve diferença significativa nas frequências de alelos e genótipos que se associam à maior susceptibilidade da ocorrência de reabsorção radicular, sendo esta três vezes maior para *IL17* e aproximadamente nove vezes para *TNF*. Lima (4) relatou redução no nível sérico de IL-17 para pacientes com reabsorção <1,5 mm, compatível com os fenótipos encontrados, todos de baixa produção exceto um deles.

Como encontrado neste trabalho, diversas enfermidades foram associadas aos polimorfismos das regiões promotoras de genes de citocinas (17-22). Há descrição de associação de polimorfismos de *IL10* com tuberculose (18), de *IL12* com neoplasia intraepitelial cervical (22), de *IL17* com câncer de pulmão e gástrico e rejeição pós-transplante de medula (17, 21, 30) e de *TNF* com pancreatite crônica (19). Na Odontologia, foram descritas associações entre os polimorfismos de *IL10* e periodontite agressiva (29), assim como de *IL17* e periodontite crônica (20, 23) e periimplantite (20).

Neste estudo, buscou-se correlacionar preferencialmente os polimorfismos e os grupos com e sem reabsorção, mais do que analisar à luz de subgrupos com mais ou menos reabsorção ou com aumento ou diminuição do nível de citocinas

séricas, considerando que para ambas medidas, muitos vieses ou fatores de confusão poderiam ter interferido.

A partir deste estudo pioneiro, novos outros devem ser desenvolvidos, em especial verificando polimorfismos no gene *IL1*, considerando que Mamata e colaboradores (2) afirmaram que entre as citocinas, somente a IL-1 α tem uma potente capacidade de estimular a reabsorção dentária radicular.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que houve associação entre os polimorfismos de regiões promotoras dos genes *IL10 -819*, *-592*, *IL17A* e *TNF -308* com reabsorção dentária radicular.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Prof. dra. Eniuce Menezes de Souza pela análise estatística realizada, à Joana Maira Valentini Zacarias e às Cirurgiãs-dentista Lays Oliveira Chaves e Vanessa Abreu Sanches Marques pelo excelente auxílio nos experimentos.

Apoio financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Laboratório de Imunogenética da UEM.

REFERÊNCIAS

1. CONSOLARO, Alberto. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 3. ed. Maringá: Dental Press, 2012. p815.
2. Mamata K *et al.* An insight into the regulatory mechanisms of cells involved in resorption of dental hard tissues. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013(May/Aug);17(2):228–233.
3. Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G. Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. *Minerva Stomatol.* 2007(Jan./Feb.);56(1-2):31-44.
4. LIMA CEO. Níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e TNFalfa e de IgG/IgE aos antígenos dentinários em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico [Tese]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, Doutorado em Patologia Experimental; 2013.
5. CONSOLARO A, HIDALGO MM. As reabsorções dentárias têm natureza imunopatológica, pelas evidências de autoimunidade. In: CONSOLARO, A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 3. ed. Maringá: Dental Press, 2012. p.199-222.
6. Ramos SP, Ortolan GO, Santos LM, Tobouti PL, Hidalgo MM, Consolaro A, Itano EN. Anti-dentine antibodies with root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 2011(Fev.);33(5):584-91.
7. Macline JK, Rabie ABM, Wong R. Does orthodontic tooth movement cause an elevation in systemic inflammatory markers? *Eur J Orthod.* 2010;32(4):435-40.
8. Hidalgo MM, Itano EN, Consolaro A. Humoral immune response of patients with dental trauma and consequent replacement resorption. *Dental Traumatol.* 2005(Ago);21(4):218-21.
9. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006(Apr.);129(4):469.
10. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod.* 2002(Apr.);72(2):175-179.
11. Shetty SK, Kumar YM, Smitha PL. Cytokines and orthodontic tooth movement. *J Dent Sci & Res.* 2011(Feb.);2(1):132-41.
12. Başaran G, Özer T, Kaya FA, Kaplan A, Hamamcı O. Interleukine-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Levels in the Human Gingival Sulcus during Orthodontic Treatment. *Angle Orthod.* 2006(Sept.);76(5):830-6.
13. Segal GR, Schiffman PH, Tuncay OC. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption. *Orthod Craniofac Res.* 2004(May);7(2):71-8.
14. Silva TA, Lara VS, Rosa AL, Cunha FQ. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge in vitro. *Oral Dis.* 2004(Sept.);10(5):258-64.
15. Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(2):S460-75.
16. Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C, Jaeger A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodontal Res.* 2003(Jun.);38(3):324-32.
17. Kaabachi W, Amor A, Kaabachi S, Rafrafi A, Tizaoui K, Hamzaoui K. Interleukin-17A and -17F genes polymorphisms in lung cancer. *Cytokine.* 2014Mar.);66(1):23–9.

18. Liang B, Guo Y, Li Y, Kong H. Association between IL-10 gene polymorphisms and susceptibility of tuberculosis: evidence based on a meta-analysis. *PLoS One*. 2014(Feb.);9(2):e88448.
19. Manjari, K. S et al. A single nucleotide polymorphism in Tumor Necrosis Factor- α (-308 G/A) as a biomarker in chronic pancreatitis. *Gene* 2014(Apr.);539(2):186-189.
20. Kadkhodazadeh M, Baghani Z, Ebadian AR, Youssefi N, Mehdizadeh AR, Azimi N. IL-17 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis and peri-implantitis in Iranian patients: a cross-sectional study. *Immunol Invest* 2013;42(2):156–63.
21. Rafiei A, Hosseini V, Janbabai G, Ghorbani A, Ajami A, Farzmandfar T, Azizi MD, Gilbreath JJ, Merrell DS. Polymorphism in the interleukin-17A promoter contributes to gastric cancer. *World J. Gastroenterol* 2013(Sept.);19(34):5693-9.
22. Carvalho VCV, Macedo JL, Lima CAD, Lima MCG, Heraclio SA, AMORIM M, Maia MMD, Porto ALF, Souza PRE. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. *Mol Biol Rep*. 2012(Jul.);39(7):7627–34.
23. Correa JD, Madeira MFM, Resende RG, Correia-Silva JF. Gomez RS, De Souza DG, Teixeira MM, Queiroz-Junior CM, Silva TA. Association between polymorphisms in Interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators of Inflamm*. 2012(Dec.);2012:1-9.
24. Wilson AG, Symons Ja, Mc Dowel TL, Mc Devitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997(Apr.);94(7):3195-9.
25. Cardozo DM. et al . Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2009(Dec.);42(6):651-56.
26. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17(7):2503-16.
27. Yılmaz V, Yentür SP, & Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 2005;30(4):188-194.
28. Reichert S, Machulla HK, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Glaser CH, Schaller HG, Stein J, Schulz S. The interleukin-10 promoter haplotype ATA is a putative risk factor for aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2008(Feb.);43(1):40-7.
29. Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Koderia Y, Nakao S. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS ONE* 2011(Oct.);6(10):e26229.
30. Lee Sun-Kyeong, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(4):411-418.
31. Liu D, Yao S, & Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):42-49.
32. Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, & Yoshida N. Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. *Arch Oral Biol*. 2012;57(1):36-43.

33. Hayashi N, Yamaguchi M, Nakajima R, Utsunomiya T, Yamamoto H, & Kasai K. T-helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. *Oral dis.* 2012;18(4):375-388.

ANEXOS

Anexo A: Instruções para autores do Dental Traumatology

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1.Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian

fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names (Family names should be underlined) and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) Experimental subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References

As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp.

Anexo B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo nos genes IL10, IL12 e IL17 em pacientes portadores de reabsorção radicular inflamatória

Pesquisador: Mirian Marubayashi Hidalgo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20657413.6.0000.0104

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Maringá

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 448.735

Data da Relatoria: 07/10/2013

Apresentação do Projeto:

Existe associação entre a produção sérica de citocinas nos pacientes portadores de reabsorção radicular externa decorrente de movimentação dentária induzida e o polimorfismo de regiões promotoras dos seus respectivos genes. CASUÍSTICA: Um Projeto foi anteriormente aprovado pelo CEP-UEM autorizando o uso de material dos 34 pacientes envolvidos na pesquisa e já finalizado mediante relatório. Agora, solicita-se autorização para o COPEP-UEM, para novo uso do material congelado e um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi elaborado. Não haverá nova coleta de material, mas tão somente o uso do material mantido congelado em uma nova metodologia. Serão utilizadas as células mononucleares de sangue periférico congeladas (PBMCs), advindas de 34 pacientes da Clínica Odontológica da UEM, os quais apresentaram reabsorção radicular inflamatória externa resultante de movimentação dentária induzida após utilização de aparelho fixo. O grupo é composto por adolescentes de 11 a 16 anos, de ambos os gêneros¹⁷. Os pacientes serão divididos em 2 grupos, segundo o grau de reabsorção dos incisivos centrais superiores direito e esquerdo, mensurados pelo Método da Subtração Radiográfica Digital (SRD)²⁰: reabsorção 1,5mm e >1,5mm¹⁷. GENOTIPAGEM DE CITOCINAS: O DNA será extraído a partir das PBMCs mantidas em nitrogênio líquido utilizando-se o Gentra Puregene Cell Kit® (Qiagen Science, Germantown, USA)²¹. Resumidamente, as células serão descongeladas em

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br



Continuação do Parecer: 448.735

banho-maria a 37°C e determinadas as concentrações celulares. A suspensão contendo 2×10^7 céls serão adicionadas ao meio de cultura e centrifugadas, mantendo-se 200 μ L de fluido residual, que será agitado em vortex para resuspensão das células. Será adicionada solução de Cell Lysis e agitado por 10s. Em seguida, será acrescentada a solução de precipitação proteica e o tubo será agitado vigorosamente em vortex por 20s. Depois disto, o tubo será novamente centrifugado para formação do bolo proteico. Isopropanol será adicionado cuidadosamente ao sobrenadante do passo anterior, misturando-os delicadamente. A centrifugação do microtubo possibilitará ver o DNA como um pequeno aglomerado branco, o sobrenadante será descartado e o tubo seco com papel absorvente. O etanol 70% será adicionado para lavar o aglomerado de DNA. Após centrifugar, o sobrenadante será descartado e o tubo seco mais uma vez, por 15min. Em seguida, a solução hidratante será adicionada e agitada por 5s. As amostras serão incubadas a 65°C por 1h para dissolução do DNA. Após esse período, a incubação será feita em temperatura ambiente por toda noite, com agitação suave. Por fim, as amostras serão rapidamente centrifugadas e armazenadas a -4° C, para posterior amplificação. Para isso, a concentração dos DNAs será verificada pelo aparelho NanoDrop 2000® (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e ajustada para aproximadamente 100ng/ μ L. A genotipagem das regiões promotoras das citocinas será realizada empregando-se o método micro SSP-DNA. Será utilizado o Easy-DNA kit box® (Invitrogen, Carlsbad, USA) de citocinas para IL-10 e IL-12 e será confeccionado um iniciador específico para a IL-17. A amostra de DNA de cada indivíduo, a solução tampão D-mix e a enzima Taq DNA polimerase serão misturados e dispensados em poços da microplaca que conterão os iniciadores específicos. A amplificação ocorrerá em termociclador Perkin-Elmer 9600 (Waltham, USA), conforme programa recomendado pelo fabricante. Os fragmentos de DNA amplificados serão separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System (MGS-B, One Lambda Inc. Canoga Park, USA), em gel de agarose a 2%, a 150V, por 5min. A visualização das bandas será realizada pela coloração com Syber green e exposição à luz ultravioleta. As reações serão documentadas em fotografias. A interpretação dos resultados será baseada na presença ou ausência de fragmentos específicos de DNA amplificados. Em todas as reações serão utilizados controles internos, que certificarão a integridade da reação com amplificação de uma região conservada do gene. As variantes da região promotora de citocinas serão definidas a partir das interpretações de fichas-padrão oferecidas pelo fabricante.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar uma possível associação entre o polimorfismo de regiões promotoras dos genes de citocinas IL10, IL12 e IL17 e sua produção sérica em pacientes apresentando reabsorção radicular

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
 Bairro: Jardim Universitário CEP: 87.020-900
 UF: PR Município: MARINGÁ
 Telefone: (44)3011-4444 Fax: (44)3011-4518 E-mail: copep@uem.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 448.735

externa decorrente da movimentação dentária induzida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão submetidos os sujeitos da pesquisa serão suportados pelos benefícios apontados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa que utilizará material biológico estocado de 34 menores de idade, apresentando para tal novo TCLE dirigido aos pais dos mesmos e com anuência dos participantes. Conforme recomendação deste comitê substituiu o texto quanto aos riscos, afirmando que Não estão previstos riscos ou desconfortos inaceitáveis. No corpo do TCLE a nova redação proposta corrigiu a incoerência apontada anteriormente, afirmando que Pedimos que autorize a utilização desse material que está congelado para nossa nova pesquisa. Não haverá necessidade de nova coleta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou novo TCLE de acordo com as normas legais. Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pelo investigador principal, Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo, e pelo Chefe Adjunto do DOD, Prof. Dr. Cleverson O. Silva. Previsão de custos da ordem de R\$ 2240,00, com a informação de que serão custeados com recursos próprios. Cronograma: início em 02/09/2013, e término em 27/02/2015. Declaração assinada pela Profa. Dra. Márcia Machado de Oliveira Dalalio, responsável pelo Laboratório de Imunogenética da UEM, autorizando a utilização do espaço físico, instalações e recursos financeiros deste laboratório para a realização da pesquisa proposta.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela.

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG

Bairro: Jardim Universitário

CEP: 87.020-900

UF: PR

Município: MARINGÁ

Telefone: (44)3011-4444

Fax: (44)3011-4518

E-mail: copep@uem.br



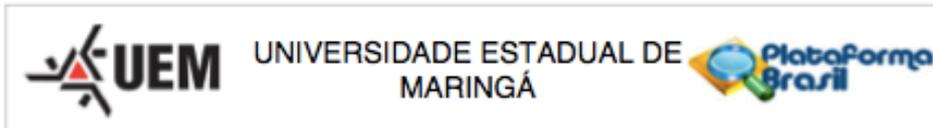
Continuação do Parecer: 448.735

MARINGÁ, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:
Ricardo Cesar Gardiolo
(Coordenador)

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br

Anexo C



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismo nos genes IL10, IL12 e IL17 em pacientes portadores de reabsorção radicular inflamatória

Pesquisador: Mirian Marubayashi Hidalgo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20657413.6.0000.0104

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Maringá

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: EMENDA

Justificativa: A presente solicitação se justifica em função da necessidade de inserir um grupo

Data do Envio: 11/07/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 781.244

Data da Relatoria: 28/07/2014

Apresentação da Notificação:

A presente solicitação se justifica em função da necessidade de inserir um grupo sem tratamento na pesquisa. Isso se deve ao fato de que o n do grupo estudado ter sido reduzido de 34 indivíduos previstos à apenas 22, pois apenas esse número de indivíduos foi localizado para autorização do uso do material biológico congelado. Para tanto, pretende-se utilizar material que já está congelado e que também foi utilizado no estudo anterior realizado em Londrina. Entre o rol de 34 indivíduos sem tratamento que possuem material congelado, buscaremos localizar e obter autorização do máximo possível. Esse grupo é composto por sujeitos sem o uso de aparelho ortodôntico com gênero e idade semelhantes ao grupo estudado. Os procedimentos utilizados serão os mesmos para os dois grupos.

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br



Continuação do Parecer: 781.244

Objetivo da Notificação:

Incluir sujeitos sem o uso de aparelho ortodôntico, com gênero e idade semelhantes ao grupo estudado originalmente, com o objetivo de alcançar o número originalmente proposto para avaliação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os riscos a que estarão sujeitos os participantes serão absorvidos pelos benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A emenda proposta não altera substancialmente o protocolo de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Acrescentou novo TCLE adaptado para o novo grupo que será avaliado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação da emenda ao protocolo de pesquisa apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação da emenda ao protocolo de pesquisa em tela.

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG	CEP: 87.020-900
Bairro: Jardim Universitário	
UF: PR	Município: MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444	Fax: (44)3011-4518
	E-mail: copep@uem.br