



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA**  
**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**PRISCILA LOPES MATIAS DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *IL1RN*,  
*IL1β*, *IL6* e *IL8* EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES**

**FORTALEZA**

**2018**

**PRISCILA LOPES MATIAS DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *IL1RN*,  
*IL1β*, *IL6* e *IL8* EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira.

**FORTALEZA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O49a Oliveira, Priscila Lopes Matias de.  
ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL1RN, IL1B, IL6 e  
IL8 EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES / Priscila Lopes Matias de Oliveira. –  
2018.  
50 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,  
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira.
1. Lesão Central de Células Gigantes. 2. IL 1RN. 3. IL 1 B. 4. IL6. 5. IL8. I. Título.

CDD 617.6

---

**PRISCILA LOPES MATIAS DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE *IL1RN*,  
*IL1β*, *IL6* e *IL8* EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Ms. Manoel de Jesus Rodrigues Mello  
Centro Universitário Christus

A Deus.  
A minha família, por tantas razões e  
pela maior de todas: amor.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, meu guia, minha luz e paz, por tudo que sou e realizei!

Aos meus pais Patrícia Lopes e Ricardo Matias, por terem me conduzido até aqui, não tenho palavras para descrever a importância de vocês em minha vida. Sou grata pela educação, pelos princípios e valores que me foram ensinados. Obrigada por todo o esforço em proporcionar estudo de qualidade, pelo incentivo, e pela torcida. Em especial, agradeço à minha mãe pela amizade, pelo amor e por nunca me deixar desistir diante de dificuldades e adversidades. Você é o meu maior símbolo de amor, a minha força.

Aos meus irmãos, que sempre acreditaram em mim, sempre confiaram nos meus esforços e mesmo de longe ou perto representam meus bons momentos de risada e crescimento pessoal em nosso lar. Aos meus outros familiares, tios, primos e avós, que direta ou indiretamente acompanham a minha trajetória e torcem com muito amor pelo meu sucesso e felicidade. Vocês sabem do amor que cultivo por cada um, amor além do parentesco, amor daqueles que são escolhidos para ser família.

Agradeço de forma especial também ao meu noivo, Giovanni Iury. Muita gratidão por caminhar ao seu lado, ter seu apoio diário, conforto em dias difíceis e admiração sempre evidente por cada passo que dou. Obrigada pela compreensão nos dias ausentes, na privação de momentos em prol da realização deste objetivo. Uma nova caminhada se inicia e agradeço a Deus pelo nosso companheirismo e fé em um amanhã ainda e sempre melhor que o hoje, que possamos sempre estar dividindo a profissão, a vida, os aprendizados e sonhos. Amo você.

Ao Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira, por ter aceitado ser orientador deste trabalho e me acolher como membro de iniciação científica desde o início, compartilhando seu vasto conhecimento em todas as oportunidades que tive. Obrigada pelos “puxões de orelha” que também contribuem para o meu crescimento pessoal. O senhor é referência de

profissional que busca sempre ser melhor no que faz, e isso é inspiração para a vida profissional dos que o acompanham de perto.

Ao Dr. Manoel Mello, por ser uma grata presença em minha graduação, pelos momentos divididos no laboratório, pelo carinho, cuidado, conselhos e pelo grande exemplo do profissional ético, humano e capacitado. Muita admiração pelo senhor como pessoa e profissional.

Ao Dr. Rafael Lima Verde, por toda ajuda no meu início no ambulatório, pelo exemplo de interesse em pesquisa, por estar sempre dando todo o apoio necessário, mesmo que a distância. Obrigada por sempre ajudar nas dúvidas, por repassar seus conhecimentos e estar sempre disponível.

Gratidão a todos do ambulatório de Cirurgia Bucomaxilofacial da UFC, aos meus professores-colegas Dr. Raimundo Thompson, Dr. Ricardo Franklin e Saulo Queiroz, vocês todos não imaginam o quanto contribuíram para o meu aprendizado, para a minha admiração por essa profissão e para meu referencial da profissional que almejo ser. Não poderia me esquecer de você Nayana Azevedo, que tanto foi suporte dentro desse meio e generosamente partilhou seus aprendizados, você merece muitas conquistas pelo exemplo de esforço e dedicação no que faz. Agradeço também a Ivna Maria, que não somente indicou minha entrada na iniciação científica, mas também fez parte de momentos da minha vida antes da graduação. Você não imagina como sou grata e o quanto foi mais leve dividir com você os momentos do ambulatório e laboratório. Sua presença nessa caminhada tornou, sem dúvida, tudo mais fácil.

À Profa. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela sua dedicação ao que faz, pelo seu trabalho sem limites de conhecimento em pesquisa. Muito obrigada por ter enriquecido esta pesquisa com seu conhecimento e brilhantes observações, pelo sua orientação cuidadosa e pelo seu entusiasmo com os avanços que conquistamos, além de ter disponibilizado seu laboratório e sua competente equipe. Conjuntamente, a todos os componentes do Laboratório de genética Molecular (LABGEM), em especial a Maíra Silva e Morgana Barboza, que me acolheram com carinho e alegria em meu início no laboratório, por

partilhar pacientemente suas habilidades e conhecimentos, além do apoio, incentivo e positividade sempre.

Gratidão a você Emanuele Oliveira, que gentilmente me apoiou tanto nessa reta final, que praticamente me pegou pela mão e me indicou o caminho dos PCR's, da estatística e de todo o conhecimento que você podia me passar. Obrigada pelo incentivo, pelas risadas e leituras de genótipos. Guardarei com muita alegria esses momentos que dividimos também com os outros membros do LABGEM. Assim como as minhas colegas de laboratório e curso, que iniciaram essa caminhada mais recentemente, mas que tem potencial. Obrigada Lara Vale e Viviane Araújo pela divisão dessas tarefas que não são fáceis, além das obrigações da faculdade. Sou grata pelos momentos que compartilhamos juntas e pela positividade e apoio de vocês.

As minhas amigas Karolyne Oliveira e Geovanna Viana. Deus sabe o carinho que tenho por vocês e o quanto faz falta tê-las na convivência diária. Obrigada pelo apoio, confiança, pelas risadas e lágrimas também. Karol, muita admiração pelas suas conquistas, pela sua postura sempre correta e atenciosa com seus pacientes. Geovanna, obrigada pelo seu jeito sempre doce de ver o mundo, de acreditar nos dias bons que virão. Vocês são cada uma a sua forma, exemplos pra mim. Obrigada a Tarciso Sindeaux e Débora Vilela pela presença em minha graduação. Pelo carinho e consideração que vocês sempre tiveram comigo. Obrigada Tarciso pelos momentos incríveis divididos na Austrália, fase marcante de nossas vidas e que firmou ainda mais nossa amizade.

Obrigada aos meus colegas de turma, referenciais de dedicação. Nós sabemos o quanto essa caminhada é árdua, estar com vocês nessa foi fundamental para chegar nessa reta final. Obrigada por me acolherem quando o trem já estava andando, vários de vocês de uma forma especial ganharam meu coração. Não poderia deixar de agradecer ao Nunes, pessoa de brilho, que tanto nos ajudou nessa reta final, alegrando a clínica integrada de uma forma inimaginável. A minha dupla-amigo, Matheus Vieira, que orgulho tenho de você, orgulho de ter você por perto em todas as fases desses seis anos e

meio. Não tenho nada além de amor, gratidão e admiração por quem você é. Escolheria você como parceiro nessa caminhada quantas vezes fosse preciso.

Agradeço ao Centro do Trauma Buco Dentário (CENTRAU), projeto que mora em meu coração desde o meu primeiro ano de graduação, aos membros que por ele passaram, orientadores e em especial ao Dr. Jeová Siebra, pelo acolhimento, humildade e generosidade em passar seus preciosos conhecimentos. Não irei esquecer todos os aprendizados e sua forma humanizada de lidar com pacientes tão pequeninos.

Agradeço aos membros do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial do Hospital Universitário Walter Cantídio, vocês representam um grupo ímpar de cirurgia. Gratidão ao Dr. Eduardo Studart e aos outros preceptores do serviço pela oportunidade de aprender com tanta qualidade e também por conviver com residentes e estagiários tão especiais. Aprendi muito com todos vocês residentes e ex-residentes, Fabrício de Lamare, Ronielle Lima, Jéssica Paz, Bárbara Lima, Rafaella Rhara, Alexandre Maranhão, Nunes Neto e Ícaro Evangelista. E aos meus companheiros de estágio, Luanda Ashley, Mariana Coutinho, Alessandra Fragoso, Allyson Lucas e, em especial, Larissa Alencar e Thaiany Carvalho, pela torcida, cuidado, maturidade e risadas juntos. Vocês são parte de um momento muito especial da minha graduação. Muito orgulho e alegria em ter feito parte desse time.

Aos pacientes pela confiança, pelos aprendizados, elogios e mimos. Gratidão a vocês por terem sido parte dessa trajetória de aprendizados. Agradeço também aos pacientes desta pesquisa, pela doação voluntária em prol de ciência, contribuindo assim para o benefício de todos. Agradeço também aos meus professores de um modo geral ao longo da faculdade, pelos ensinamentos teóricos, práticos, conselhos e incentivo. Não somos nada sozinhos, o aprendizado é um ciclo e muitos de vocês horam de forma excepcional a profissão que escolheram.

Por fim, agradeço a cada pessoa que não consegui aqui mencionar, mas que de forma especial compartilharam um pouco de si em minha vida. Tenho muito a agradecer por estarem comigo até aqui. Gratidão é a palavra que me guia e me ensina a ser melhor a cada dia

## RESUMO

Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) é uma patologia intraóssea incomum, classificada em agressiva e não agressiva, de patogênese incerta, inexistindo concordância se é neoplásica ou reativa, porém a atividade proliferativa foi demonstrada em células estromais, sugerindo possibilidade de desregulação do ciclo celular na patogênese. Objetivo: Analisar o polimorfismo em genes envolvidos no processo inflamatório em pacientes com a lesão. Dentre eles, o de *IL1 $\beta$  -511C/T*, *IL1RN (VNTR)*, *IL6 -174 G/C* e *IL8 -251 A/T*. Para isso, foi coletado sangue de 14 pacientes. A presença dos polimorfismos foi determinada pela extração de DNA, por PCR e por PCR-RFLP. Dos casos estudados, 10 eram do sexo feminino e 4 do masculino, sendo 10 agressivos e 4 não agressivos, ocorrendo uma proporção de 1:1 maxila/mandíbula. Dentre os 14 casos, 10 apresentaram genótipo (L/L), 2 (L/2\*) e 2 (2\*/2\*) para *IL1 RN*. Para *IL1 B*, 5 foram (T/T), 7 (C/T) e 2 (C/C). Para *IL6*, 10 (G/G), 3 (G/C), 1 (C/C) e para *IL8*, 3 (A/A), 8 (A/T), 3 (T/T). Foi verificada a importância do alelo polimórfico de *IL6* na condição de proteção à LCCG ( $p=0,00037$ ). Não se verificou significância estatística quando comparados os grupos agressivo e não agressivo da lesão, mas de forma oposta, a *IL6* teve  $p$  significativo quando feita a comparação entre os grupos agressivo e controle ( $p=0,00024$ ); e entre os grupos não agressivo e controle ( $p=0,00065$ ). Obteve-se também associações significativas de *IL6* com o polimorfismo de *IL1 $\beta$  -511C/T*, *IL1RN (VNTR)* e *IL8 -251 A/T* para variadas combinações de genótipo de forma a confirmar a dominância do alelo polimórfico de *IL6*. Conclui-se que citocinas podem ter papel na melhor compreensão da patogênese e do comportamento clínico, contribuindo para o entendimento da susceptibilidade genética e severidade da lesão. Entretanto, novos estudos com maior casuística associando essas e outras interleucinas devem ser realizados para esclarecer essas correlações.

Palavras-chave: Lesão Central de Células Gigantes. Polimorfismos. Citocinas *IL 1RN*; *IL 1 $\beta$* ; *IL6* e *IL8*.

## ABSTRACT

Central Giant Cell Lesion is an intraosseous lesion, classified as aggressive and non-aggressive, of uncertain pathogenesis. There is no agreement on whether it is neoplastic or reactive, but the proliferative activity was demonstrated in stromal cells, suggesting the possibility of deregulation of the cell cycle in the pathogenesis. Objective: to analyse polymorphism in genes involved in inflammation in patients with the injury, among them, *IL1 $\beta$  -511C/T*, *IL1RN (VNTR)*, *IL6 -174 G/C* e *IL8 -251 A/T*. In order to do this, blood of 14 patients was collected. The presence of polymorphisms was determined by DNA extraction, by PCR and by PCR-RFLP. Of the cases studied, 10 were female and 4 were male, 10 were aggressive and 4 were non-aggressive, having a 1: 1 maxilla / mandible ratio. Among the 14 cases genotype, 10 were (L/L), 2 (L/2\*) and 2 (2\*/2\*) for *IL1RN*. For *IL1 $\beta$* , 5 were (T/T), 7 (C/T) and 2 (C/C). For *IL6*, 10 (G/G), 3 (G/C), 1 (C/C) and for *IL8*, 3 (A/A), 8 (A/T), 3 (T/T). The importance of the polymorphic allele of *IL6* in the LCCG protection condition ( $p = 0.00037$ ) was verified. There was no statistical significance for any interleukin when comparing the aggressive and non-aggressive groups of the lesion, but in contrast, the *IL6* had a significant difference when the aggressive and control groups were compared ( $p = 0.00024$ ); and between the non-aggressive and control groups ( $p = 0.00065$ ). Associations of *IL6* with the *IL1 $\beta$  -511C/T*, *IL1RN (VNTR)* and *IL8-251 A/T* polymorphisms were also obtained for the genotype combinations in order to confirm the dominance of the polymorphic allele of *IL6*. It is concluded that cytokines may play a role in better understanding of the pathogenesis and clinical behavior, contributing to the understanding of genetic susceptibility and severity of the injury. However, further studies with larger sample relating other interleukins should be performed to clarify these correlations.

**Keywords:** Central Giant Cell Lesion. Polymorphisms. Cytokines *IL-1RN*, *IL- $\beta$* , *IL6* and *IL8*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Caso clínico de LCCG..... 16

**Figura 2**– Histopatológico em LCCG..... 17

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -Epidemiologia da lesão de LCCG.....	25
<b>Tabela 2</b> –Frequências de genótipos Em LCCG e Controle.....	26
<b>Tabela 3</b> -Distribuição de pacientes com LCCG e Controle de acordo com <i>IL1RN</i> e <i>IL1β</i> genótipos e alelos.....	27
<b>Tabela 4</b> -Distribuição de pacientes com LCCG e Controle de acordo com <i>IL6</i> e <i>IL8</i> genótipos e alelos.....	28
<b>Tabela 5</b> – Comparação dos grupos Agressivo com Não Agressivo.....	29
<b>Tabela 6</b> – Comparação dos grupos Agressivo com Controle.....	30
<b>Tabela 7</b> – Comparação dos grupos Não agressivo com Controle.....	31
<b>Tabela 8</b> – Associação de <i>IL1RN</i> com <i>IL1β</i> .....	32
<b>Tabela 9</b> – Associação de <i>IL1RN</i> com <i>IL6</i> .....	33
<b>Tabela 10</b> – Associação de <i>IL1RN</i> com <i>IL8</i> .....	34
<b>Tabela 11</b> – Associação de <i>IL1β</i> com <i>IL6</i> .....	35
<b>Tabela 12</b> – Associação de <i>IL1β</i> com <i>IL8</i> .....	36
<b>Tabela 13</b> – Associação de <i>IL6</i> com <i>IL8</i> .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>LCCG</b>	Lesão Central de Células Gigantes
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>IL</b>	Interleucina
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Fragmentos de Restrição
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>TBE</b>	Tris Borato EDTA
<b>VNTR</b>	Variable Number of Tandem Repeats
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>CEM</b>	Células estromais mononucleadas
<b>CGM</b>	Células gigantes multinucleadas
<b>RANK</b>	Fator de ativação do receptor de ativação nuclear kappa B
<b>TRAP</b>	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
<b>LABGEM</b>	Laboratório de Genética Molecular
<b>AL</b>	Alelo Longo
<b>AC</b>	Alelo Curto
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
%	Porcentagem
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
$\mu\text{L}$	Microlitro
®	Marca Registrada
$\mu\text{M}$	Micromolar
ng	Nanograma

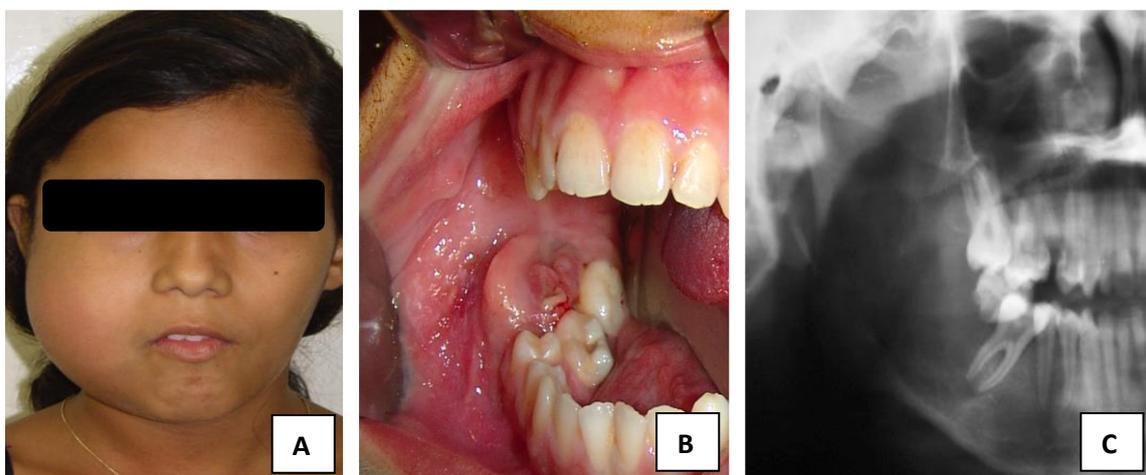
## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1 Aspectos éticos.....	20
2.2 População.....	20
2.3 2.3 Extração de DNA.....	21
2.4 Polimorfismo em <i>IL 1RN</i> .....	22
2.5 Polimorfismo em <i>IL 1β</i> .....	22
2.6 Polimorfismo em <i>IL6</i> .....	23
2.7 Polimorfismo em <i>IL8</i> .....	24
2.8 Análise Estatística.....	24
3. RESULTADOS.....	25
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS.....	43

## 1. INTRODUÇÃO

Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) dos maxilares é uma patologia intraóssea incomum, que ocorre exclusivamente na região maxilofacial, e compreende cerca de 7% de todos os tumores benignos dos maxilares<sup>1,3,5,6</sup>. Não obstante classificada como uma lesão benigna, essa patologia apresenta comportamento clínico variável, podendo ser classificada em lesões agressivas e não agressivas<sup>2,3</sup>.

A apresentação clínica não agressiva de LCCG é de aumento de volume assintomático, de crescimento lento e não envolve perfuração da cortical óssea. Em LCCG agressiva, crescimento rápido, sintomatologia dolorosa, reabsorção radicular, deslocamento dentário e destruição óssea local e perfuração cortical podem estar presentes. Além disso, em muitos casos, geram assimetrias faciais, destruição tecidual, apresentando também tendência para recorrência após o tratamento<sup>2,9</sup>. Por tais motivos, causam tanto no seu desenvolvimento, como no tratamento, consequências mutiladoras na face. LCCG mostra uma predileção em pacientes do sexo feminino (2:1)<sup>3,6,11</sup>, com localização mais comum na mandíbula que na maxila (2:1)<sup>11</sup>, mais especificamente região anterior da mandíbula, e predominantemente ocorre antes dos 30 anos de idade<sup>3,6,9</sup>.



**Figura 1:** (A)- Aspecto extraoral de assimetria facial em paciente com LCCG região posterior direita de mandíbula. (B)-Aspecto Intraoral da lesão, com aumento de volume e

afastamento dentário em região posterior de mandíbula. (C) -Imagem panorâmica com aspecto de grande área radiolúcida e reabsorção óssea. Arquivo Dr. Renato Maia

Não há concordância quanto à patogênese da LCCG. Existe até dúvida se a LCCG é uma lesão neoplásica ou um processo reativo<sup>15</sup>. Seja pela suspeita de lesões encontradas em locais de exodontias apontando uma natureza reativa da LCCG<sup>12</sup>; ou no caso de lesões agressivas, com crescimento rápido e altas taxas de recorrência que sugerem uma natureza neoplásica desta lesão. Histologicamente, a LCCG apresenta estroma fibroso com exsudato hemorrágico, grande número de vasos, depósitos de hemossiderina, focos de osteóide<sup>13</sup> e células gigantes multinucleadas (CGM) distribuídas irregularmente em um fundo celular composto por células estromais mononucleadas (CEM) com núcleo de formato ovalado ou fusiforme<sup>1,6</sup> (Fig. 3 e Fig. 4). Na variante agressiva, as CGM são usualmente mais numerosas, maiores, com maior quantidade de núcleos, e uniformemente distribuídas pela lesão<sup>15</sup>.

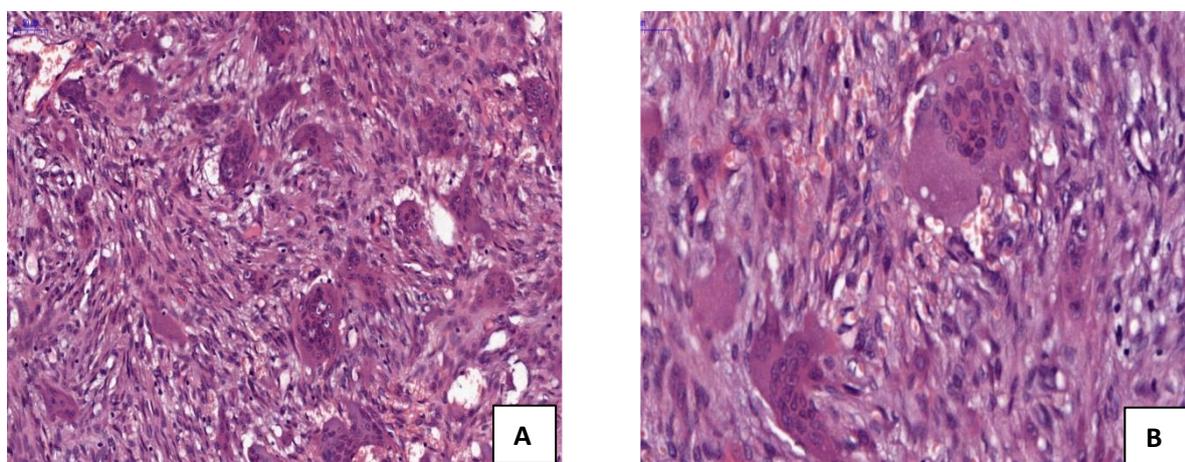


Figura 2- (A) Histopatológico em LCCG, aspecto de células multinucleadas em rico estroma fibroso com células estromais de núcleo com formato ovalado ou fusiforme. (B) Maior aumento da imagem A. Arquivo Dr. Renato Maia.

Por meio de estudos recentes acerca da patogênese da LCCG, tem-se levantado a possibilidade de desregulação no ciclo celular de células fusiformes das CEM através da presença de atividade proliferativa destas. Em tumores, a expressão aberrante de variadas ciclinas podem causar

anormalidades no seu ciclo celular, direcionando uma progressão desregulada desse ciclo<sup>14</sup>.

De acordo com alguns estudos, é notado que a patogênese molecular de LCCG indica que alterações genéticas podem estar implicadas na etiologia de alguns casos da lesão<sup>15</sup>. Os autores sugeriram que as lesões que se comportam como neoplasmas (lesões agressivas), por meio de um evento epigenético que ocorre com as células mesenquimais do osso, resultam em perda de controle do ciclo celular, bem como na expressão das proteínas que são capazes de recrutar monócitos e promoverem diferenciação em osteoclastos. Dessa forma, os autores apontam que o estudo molecular dessa lesão possibilitaria o conhecimento necessário para o controle sobre a proliferação das CEM, que parecem ser as responsáveis em conduzir esse tumor, direcionando uma terapia mais benéfica para o paciente com essa lesão<sup>7</sup>. É necessária então a compreensão de possíveis alterações genéticas e biomoleculares da lesão, sua vias de proliferação, seus mecanismos de modificação do comportamento, para que assim possam-se desenvolver formas mais conservadoras de tratamento<sup>7,90</sup>.

Citocinas inflamatórias, como interleucina 1 (*IL-1*), interleucina 6 (*IL6*) e interleucina 8 (*IL8*) apresentam papel importante na reabsorção óssea induzindo a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e prostaglandinas bem como na diferenciação e indução osteoclástica<sup>17,18,19,21</sup>. Tais ILs podem ter sua expressão alterada através de polimorfismos genéticos, dessa forma, alterando a resposta inflamatória do paciente com LCCG<sup>20</sup>.

A família *IL-1* é multifuncional e tem três membros muito bem estudados, dois agonistas - *IL-1 $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  - e o antagonista *IL-1Ra*. A *IL-1Ra* inibe a ação inflamatória induzida pela *IL-1* ao bloquear a ligação de *IL-1* ao receptor tipo I da *IL-1* (*IL-1RI*). *IL-1Ra* se expressa pelo gene *IL1RN*<sup>18,22</sup>. Dentro desse contexto, qualquer alteração que leve à mudança na resposta normal de inflamação pode modificar o processo de reabsorção óssea de uma patologia.

A interleucina 6 é produzida por variadas células como linfócitos, macrófagos e monócitos. Essa IL pode ter atividade inflamatória ou anti-inflamatória, através do controle de níveis de citocinas pró-inflamatórias<sup>17,20</sup>. Essa IL encontra-se elevada em tecidos inflamados e é capaz de estimular a

formação de osteoclastos e reabsorção óssea. Devido a sua presença em diferentes tecidos do corpo e em qualquer tipo de inflamação, frequentemente os níveis de *IL6* estão correlacionados à gravidade das doenças<sup>21,23</sup>.

A *IL8* é produzida por ampla variedade de células como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e principalmente por macrófagos. Age tanto como quimioatrator de linfócitos e neutrófilos assim como na sua ativação, parecendo estimular seletivamente a atividade da metaloproteinase(MMP) dessa célula. Esta IL também induz proliferação celular, angiogênese e migração celular<sup>17,20</sup>.

A alteração na atividade biológica pode ser decorrente de polimorfismos genéticos. Os genes polimórficos apresentam variantes alélicas com frequência superior a 1% na população. Estima-se que cerca de 90% das variações de sequências em seres humanos são causadas por polimorfismos de substituição da base nitrogenada de um único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)<sup>20</sup>.

Dentro desse contexto, esse estudo se designou a estudar o polimorfismo de quatro interleucinas descritas como sendo importantes para a susceptibilidade e severidade de doenças inflamatórias (*IL1β -511C>T*, *IL1RN (VNTR)*, *IL6 -174G>C* e *IL8 -251A>T*). O polimorfismo genético em genes de interleucinas altera sua expressão e, conseqüentemente podem ser importantes no contexto dessa patologia oral, uma vez que estão relacionadas ao processo de modulação da inflamação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Aspectos éticos**

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza, com o número de protocolo 54868216.6.0000.5052, respeitando a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

Aos familiares e responsáveis, foram garantidos o sigilo das informações e o anonimato, de acordo com as normas éticas da investigação científica.

### **2.2 População**

Foram incluídos nesse estudo 14 pacientes com LCCG e 53 controles para o estudo dos polimorfismos genéticos das interleucinas. Na presente pesquisa participaram pacientes com diagnóstico histopatológico de LCCG, com laudos histopatológicos do laboratório de Anatomia Patológica Bucomaxilofacial da Universidade de Fortaleza, e atendidos na Universidade Federal do Ceará, Universidade de Fortaleza, Hospital Batista Memorial e Hospital Geral de Fortaleza.

Critério de inclusão: Paciente com diagnóstico histopatológico de LCCG realizados no laboratório da Universidade de Fortaleza.

Critérios de exclusão: Pacientes com diagnóstico de hiperparatireoidismo, querubismo ou tumor marrom; pacientes sem dados clínicos ou imaginológicos suficientes para classificação de agressividade da LCCG.

Foram coletadas amostras de sangue, 5ml, de 14 pacientes. Para avaliar os casos foi realizada a análise da presença de polimorfismos em *IL 1RN*, *IL 1β*, *IL6* e *IL8*. Estas amostras de sangue foram conservadas em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR).

### 2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizados 5 ml de sangue periférico coletados dos pacientes. Os leucócitos foram obtidos após a realização do buffy-coat, processo que envolve a lise das hemácias.

A extração do DNA, utilizando o método de salting-out<sup>32</sup>, foi realizada em seguida ao buffy-coat. Nos casos em que o procedimento não foi imediato, o pellet de leucócitos foi armazenado em freezer, em uma temperatura de -20° C, para posterior extração em até 15 dias, sendo o ideal em até 48 horas após a coleta. A quantificação do DNA foi determinada utilizando NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Wilmington, DE, USA) e a qualidade do DNA extraído foi analisada no gel de agarose 1%.

Os polimorfismos genéticos de *IL1β* -511C/T (rs16944), *IL6* -174G/C(rs1800795) and *IL8* -251A/T (rs4073) foram detectados por PCR-RFLP, e o polimorfismo de *IL1RN* foi detectado por PCR (Tabela 1).

Todas as reações para detecção de polimorfismo e suas análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular- LABGEM da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 1: Primers e protocolos usados para PCR-RFLP.

Polimorfismo	Sequência do primer	Fragmento de PCR	Enzima de restrição	Referência
IL1 β -511C/T (rs16944)	F 5' TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC 3' R 5' GTT TAG GAA TCT TCC CACTT 3'	304pb	Ava I	Upadhyay et al., 2008.
IL1RN VNTR	F 5' CTCAGCAACACTCCTAT 3' R 5' TCCTGGTCTGCAGGTAA 3'	240, 326, 412, 484 498pb	-	Upadhyay et al., 2008.
IL6 -174G/C (rs1800795)	F 5' TGA CTTCAGCTTTACTCTTTGT 3' R 5' CTGATTGGAAACCTTATTAAG 3'	198pb	Sfa I	FernandezReal et al., 2000
IL8 -251A/T (Rs4073)	F 5' CCATCATGATAGCATCTGTA 3' R 5' CCACAATTTGGTGAATTATTAA 3'	173pb	Ase I	Wei et al., 2007.

## 2.4 Polimorfismo em *IL 1RN*

A variação polimórfica do gene da *IL1RN* foi detectada por meio da análise do DNA genômico, utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x GoTaq® Master Mix (Promega), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de DNA e água nuclease free suficiente para 20µL.

A região polimórfica foi amplificada por PCR: a desnaturação inicial foi de 95°C/5 minutos, sendo estabelecidos 40 ciclos para desnaturação (95°C/1 minuto), anelamento dos primers (55°C/50 segundos) e extensão (72°C/1 minuto).

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% corado com nitrato de prata, utilizando um marcador de 50 pares de bases (pb). Poderiam ser encontrados os alelos *IL 1RN*\*1 (L/L) correspondendo a um fragmento de 410 pb (04 cópias de uma sequência de 86 pb), *IL 1RN*\*2(C/C) correspondendo a um fragmento de 240 pb (02 cópias de mesma sequência), *IL 1RN*\*3 correspondendo a um fragmento de 325 pb (03 cópias de mesma sequência), *IL 1RN*\*4 com um fragmento de 500 pb (05 cópias de mesma sequência), *IL 1RN*\*5 com um fragmento de 585 pb (06 cópias de mesma sequência), *IL 1RN*\*6 com um fragmento de 155 pb, 01 cópia de mesma sequência, (Upadhyay et al., 2008). Os alelos com 3, 4, 5 e 6 cópias foram enquadrados no grupo de alelos longos (AL), enquanto que os alelos com 1 ou 2 repetições ficaram no grupo de alelos curtos (AC)<sup>26</sup>. Para *IL1RN* os genótipos obtidos são selvagem L/L, heterozigoto L/2\* e homozigoto polimórfico 2\*/2\*.

## 2.5 Polimorfismo em *IL 1β*

A presença do polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) da interleucina *IL 1β* foi detectada por meio da análise do DNA genômico, utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (restriction fragment length polymorphism). Na reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x GoTaq® Master Mix (Promega), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de DNA e água nuclease free suficiente

para 20 $\mu$ L. A temperatura de anelamento foi de 55,5°C com amplificação de fragmento de 304 pares de bases (Upadhyay et al., 2008). O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. Os produtos gerados foram submetidos à digestão enzimática com 4U da endonuclease de restrição Ava1, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 7,5 $\mu$ L. Os fragmentos resultantes da restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. A genotipagem das amostras foi feita baseando-se nos diferentes tamanhos de fragmentos gerados: genótipo homozigoto polimórfico TT (304pb), genótipo heterozigoto CT (304, 190 e 114pb) e genótipo selvagem CC (190 e 114pb).

## **2.6 Polimorfismo em *IL6***

A presença do polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) da interleucina IL-6 foi detectada por meio da análise do DNA genômico, utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (restriction fragment length polymorphism). Amostras genotipadas previamente e possuidoras dos sítios de clivagem para a enzima de restrição utilizada, foram usadas como controle das reações de restrição enzimática. Na reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x GoTaq® Master Mix (Promega), 0,4 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de DNA e água nucleasse free suficiente para 20 $\mu$ L. A temperatura de anelamento foi de 55°C com amplificação de fragmento de 198 pares de bases (Fernandez-Real et al., 2000). O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. Os produtos gerados foram submetidos à digestão enzimática com 4U da endonuclease de restrição SfaNI, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 7,5 $\mu$ L. Os fragmentos resultantes da restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. A genotipagem das amostras foi feita baseando-se nos diferentes tamanhos de fragmentos gerados: genótipo selvagem GG (140pb), genótipo heterozigoto GC (140 e 198pb) e genótipo homozigoto polimórfico CC (198pb).

## **2.7 Polimorfismo em *IL8***

A presença do polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) da interleucina IL-8 foi detectada por meio da análise do DNA genômico, utilizando Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e RFLP (restriction fragment length polymorphism). Amostras genotipadas previamente e possuidoras dos sítios de clivagem para a enzima de restrição utilizada, foram usadas como controle das reações de restrição enzimática. Na reação de PCR foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x GoTaq® Master Mix (Promega), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 50 ng de DNA e água nuclease free suficiente para 20µL. A temperatura de anelamento foi de 57°C com amplificação de fragmento de 173 pares de bases (Wei et al., 2007). O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. Os produtos gerados foram submetidos à digestão enzimática com 4U da endonuclease de restrição Ase1, acrescida do tampão sugerido pelo fabricante em um volume final de 7,5µL. Os fragmentos resultantes da restrição foram visualizados em gel de poliacrilamida 7% corado com nitrato de prata. A genotipagem das amostras foi feita baseando-se nos diferentes tamanhos de fragmentos gerados: genótipo selvagem AA (152pb), genótipo heterozigoto AT (152 e 173pb) e genótipo homozigoto polimórfico TT (173pb).

## **2.8 Análise Estatística**

Os dados foram tabulados no Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% e expressos na forma de frequência absoluta e percentual. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para avaliação entre grupos. Um valor de p menor ou igual a 0.05 foi considerado significativo.

### 3.RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os dados epidemiológicos e clínicos dos 14 pacientes com LCCG. Os pacientes foram predominantemente do sexo feminino. A idade variou de 5 a 38 anos de idade com uma mediana de idade de 22 anos. Considerando o ponto de corte de 22 anos, não houve predominância de grupo de idade. Quanto à localização, a lesão foi igualmente distribuídas na maxila 50% (7/14) e na mandíbula 50% (7/14) com um maior número de padrões agressivos com 71,42% (10/14). No grupo controle, a idade variou de 17 a 38 anos de idade com uma mediana de idade de 26,9 anos. Todos os pacientes foram avaliados com sucesso para os polimorfismos estudados.

**Tabela 1-** Epidemiologia da casuística de LCCG

	N	%
<b>Sexo</b>		
Feminino	10	71,42
Masculino	4	28,57
<b>Idade</b>		
Até 22 anos	8	57,14
Mais de 22 anos	6	42,85
<b>Maxilar</b>		
Maxila	7	50,0
Mandíbula	7	50,0
<b>Agressividade</b>		
Não Agressivo	4	28,57
Agressivo	10	71,42

#### ***Estudo dos polimorfismos de IL 1 $\beta$ -511C>T, IL1RN (VNTR), IL6 -174G>C e IL8 -251A>T.***

A tabela 2 mostra a distribuição dos genótipos das Interleucinas estudadas nos casos de LCGC distribuídos de acordo com a gravidade da lesão e os controles. Apesar do n reduzido de casos, os genótipos homozigotos polimórficos foram bem representados.

O genótipo selvagem foi o mais representado para *IL1RN* tanto no caso como no controle e para *IL6* somente em LCCG. Por outro lado os heterozigotos foram os mais frequentes para a *IL1 $\beta$*  e *IL8*.

**Tabela 2:** Frequência de genótipos em LCCG e Controle

	LCCG N=14			Controle N=53 n(%)
	Agressivos N=10 n(%)	Não agressivos N=4 n(%)	Total N=14 n(%)	
<b>IL 1 RN</b>				
L/L	7(70,0)	3(75,0)	10(71,4)	33(62,3)
L/2*	2(20,0)	-	2(14,3)	16(30,2)
2*/2*	1(10,0)	1(25,0)	2(14,3)	4(7,5)
<b>IL 1 <math>\beta</math></b>				
C/C	4(40,0)	1(25,0)	5(35,71)	19(35,8)
C/T	5(50,0)	2(50,0)	7(50,0)	26(49,1)
T/T	1(10,0)	1(25,0)	2(14,88)	8(15,1)
<b>IL6</b>				
G/G	7(70,0)	3(75,0)	10(71,4)	2(3,8)
G/C	3(30,0)	-	3(21,4)	41(77,4)
C/C	-	1(25,0)	1(7,1)	10(18,9)
<b>IL8</b>				
A/A	3(30,0)	-	3(21,4)	21(39,6)
A/T	4(40,0)	4(100,0)	8(57,1)	26(49,1)
T/T	3(30,0)	-	3(21,4)	10(18,9)

As Comparações entre distribuição das frequências genótípicas dos pacientes com LCCG com o grupo controle, tendo como referencia o genótipo selvagem, são apresentadas nas tabelas 3 e 4.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos apesar de ser observada uma maior frequência do genótipo polimórfico de *IL1RN* em detrimento de menor frequência dos heterozigotos nos casos de LCCG em

relação ao controle. Essa ausência de significância é confirmada nos modelos dominante para ambas as enzimas ( $2^*/2^* + L/2^*$  para *IL1RN*, T/T + C/T para *IL1β*).

**Tabela 3:** Distribuição de pacientes com LCCG e Controle de acordo com *IL1RN* e *IL1β* genótipos e alelos.

Genótipo/Alelo	Total N=67 n(%)	LCCG N=14	Controle N=53 n(%)	OR [95%CL]	P -value
<b><i>IL1RN</i></b>					
L/L	43(64,17)	10(71,4)	33(62,3)	-	-
L/2*	18(26,86)	2(14,3)	16(30,2)	0,41(0,05-2,41)	0,48
2*/2*	6(8,95)	2(14,3)	4(7,5)	1,65(0,18-13,28)	0,62
L/L + L/*2	61(91,04)	12(85,71)	49(92,45)	0,81(0,28-2,31)	0,65
2*/2* + L/*2	24(35,82)	4(28,57)	20(37,73)	0,66(0,15-2,74)	0,52
<b><i>IL1β</i></b>					
C/C	24(35,82)	5(35,71)	19(35,8)	-	-
C/T	33(49,25)	7(50,0)	26(49,1)	1,02(0,24-4,47)	0,97
T/T	10(14,92)	2(14,88)	8(15,1)	0,95(0,10-7,70)	1
C/C+C/T	57(85,07)	12(85,71)	45(84,90)	1,01(0,28-3,86)	0,98
T/T + C/T	43(64,17)	9(64,28)	34(64,15)	1,01(0,25-4,09)	0,99

Por outro lado a presença do alelo polimórfico da *IL6 -174G>C* mostrou-se altamente significativa, onde a presença desse alelo é associada à proteção ou ao desenvolvimento da lesão. Observa-se uma maior frequência do genótipo selvagem nos pacientes com lesão comparados com o controle (71,4% vs 3,6%, respectivamente), por outro lado uma maior frequência do genótipo homocigoto polimórfico no controle.

O mesmo ocorre na comparação do genótipo heterozigoto. Semelhante a *IL1β* -511C>T nenhum resultado significativo foi observado para a *IL8* 251A>T.

**Tabela 4:** Distribuição de pacientes com LCCG e Controle de acordo com *IL6* e *IL8* genótipos e alelos

<b>Genótipo/Alelo</b>	<b>Total N=67 n(%)</b>	<b>LCCG N=14 n(%)</b>	<b>Controle N=53 n(%)</b>	<b>OR [95%CI]</b>	<b>p-value</b>
<b><i>IL6</i></b>					
G/G	12(17,91)	10(71,4)	2(3,8)	-	-
G/C	44(65,67)	3(21,4)	41(77,4)	0,01(0-0,13)	0,0000005*
C/C	11(16,41)	1(7,1)	10(18,9)	0,02(0-0,34)	0,00037*
G/G + G/C	56(83,58)	13(92,85)	43(81,13)	0,06(0,01-0,36)	0,00016*
C/C + G/C	55(82,08)	4(28,67)	51(96,22)	0,02(0-0,12)	0,0000002*
<b><i>IL8</i></b>					
A/A	24(35,82)	3(21,4)	21(39,6)	-	-
A/T	34(50,74)	8(57,1)	26(49,1)	2,15(0,43-11,85)	0,33
T/T	13(19,40)	3(21,4)	10(18,9)	3,5(0,41-31,81)	0,3
A/A+A/T	58(86,56)	11(78,57)	47(88,67)	1,64(0,37-8,31)	0,98
T/T + A/T	47(70,14)	11(78,57)	36(67,92)	2,41(0,53-12,43)	0,2

\*p<0,05 (estatisticamente significante)

**Comparações de LCCG considerando a gravidade da lesão e grupo controle**

Apesar do pequeno número de lesões não agressivas foi realizado a comparações entre o grupo Agressivo e o Não agressivo e as mesmas com o controle. Na análise comparando as LCCG agressiva e não agressiva não foi encontrado nenhum resultado significativo para os polimorfismos avaliados. (Tabela 5)

**Tabela 5:** Agressivo X Não agressivo

	<b>LCCG N=14 n(%)</b>	<b>Agressivos N=10 n(%)</b>	<b>Não agressivos N=4 n(%)</b>	<b>OR [95%CL]</b>	<b>p-value</b>
<b>IL1RN</b>					
L/L	10(71,4)	7(70,0)	3(75,0)	-	-
L/2*	2(14,3)	2(20,0)	0	x	1
2*/2*	2(14,3)	1(10,0)	1(25,0)	0,43(0,01-23,33)	1
<b>IL1β</b>					
C/C	5(35,71)	4(40,0)	1(25,0)	-	-
C/T	7(50,0)	5(50,0)	2(50,0)	0,63(0,02-16,51)	1
T/T	2(14,88)	1(10,0)	1(25,0)	0,25(0-22,36)	1
<b>IL6</b>					
G/G	10(71,4)	7(70,0)	3(75,0)	-	-
G/C	3(21,4)	3(30,0)	0	X	0,52
C/C	1(7,1)	0	1(25,0)	0(0-11,05)	0,36
<b>IL8</b>					
A/A	3(21,4)	3(30,0)	0	-	-
A/T	8(57,1)	4(40,0)	4(100,0)	0(0-4,53)	0,23
T/T	3(21,4)	3(30,0)	0	x	x

Já na comparação do grupo Agressivo com o grupo Controle, o polimorfismo para a *IL6* apresentou *p* significativa para o genótipo heterozigoto (GC) (*p*=0,000024) e polimórfico (CC) (*p*=0,0007). Para essa mesma análise em relação aos outros três polimorfismos estudados nenhuma significância foi encontrada. (Tabela 6).

**Tabela 6:** Agressivo X Controle

	<b>LCCG N=14 n(%)</b>	<b>Agressivos N=10 n(%)</b>	<b>Controle N=53 n(%)</b>	<b>OR [95%CL]</b>	<b>p-value</b>
<b><i>IL1RN</i></b>					
L/L	10(71,4)	7(70,0)	33(62,3)	-	-
L/2*	2(14,3)	2(20,0)	16(30,2)	0,59	0,7
2*/2*	2(14,3)	1(10,0)	4(7,5)	1,18(0-15,14)	1
<b><i>IL1β</i></b>					
C/C	5(35,71)	4(40,0)	19(35,8)	-	-
C/T	7(50,0)	5(50,0)	26(49,1)	0,91(0,18-4,79)	1
T/T	2(14,88)	1(10,0)	8(15,1)	0,59(0,02-7,64)	1
<b><i>IL6</i></b>					
G/G	10(71,4)	7(70,0)	2(3,8)	-	-
G/C	3(21,4)	3(30,0)	41(77,4)	0,02(0-0,19)	0,000024*
C/C	1(7,1)	0	10(18,9)	0(0-0,33)	0,0007*
<b><i>IL8</i></b>					
A/A	3(21,4)	3(30,0)	21(39,6)	-	-
A/T	8(57,1)	4(40,0)	26(49,1)	1,08(0,17-6,98)	1
T/T	3(21,4)	3(30,0)	10(18,9)	3,5(0,41-31,81)	0,3

\**p*<0,05 (estatisticamente significativa)

Apesar do N reduzido foi também observado significância para *IL6*, comparando o grupo Não Agressivo com o grupo Controle, onde o genótipo heterozigoto (GC) mostrou proteção para o desenvolvimento da lesão. Não foi observado resultado significativo para os polimorfismos de *IL1RN*, *IL1β* e *IL8*.

**Tabela 7:** Não agressivo x Controle

	<b>LCCG N=14 n(%)</b>	<b>Não agressivos N=4 n(%)</b>	<b>Controle N=53 n(%)</b>	<b>OR [95%CL]</b>	<b>p-value</b>
<b><i>IL1RN</i></b>					
L/L	10 (71,4)	3(75,0)	33(62,3)	-	-
L/2*	2 (14,3)	-	16(30,2)	0(0-5,30)	0,54
2*/2*	2(14,3)	1(25,0)	4(7,5)	2,75 (0-48,36)	0,41
<b><i>IL1β</i></b>					
C/C	5(35,71)	1(25,0)	19(35,8)	-	-
C/T	7(50,0)	2(50,0)	26(49,1)	1,46(0,09-44,12)	1
T/T	2(14,88)	1(25,0)	8(15,1)	2,38(0-102,27)	0,53
<b><i>IL6</i></b>					
G/G	10 (71,4)	3(75,0)	2(3,8)	-	-
G/C	3 (21,4)	-	41(77,4)	0 (0-0,2)	0,00065*
C/C	1(7,1)	1(25,0)	10(18,9)	0,07 (0-1,50)	0,06
<b><i>IL8</i></b>					
A/A	3(21,4)	3(30,0)	-	-	-
A/T	8(57,1)	4(40,0)	4(100,0)	X	X
T/T	3(21,4)	3(30,0)	-	X	X

\*p<0,05 (estatisticamente significante)

### Comparações da LCCG e controle considerando as associações

Com o objetivo de observar as relações entre os genótipos das IL estudadas, foi realizada análise de associações genóticas de duas a duas enzima, cujas análises são mostradas nas tabelas 8 a 13. Por essas tabelas observa-se que os resultados significativos foram sempre associados com o polimorfismo da IL6 (tabelas 9,11 e 13). Nota-se ainda que para a associação dos genótipos de IL1RN com IL1B(TABELA 8), IL1RN com IL8(TABELA 10) e IL1B com IL8(TABELA12) não se encontrou *p* significante.

**Tabela 8: IL1RN E IL1 $\beta$**

Genótipos <i>ILRN + IL1<math>\beta</math></i>	N °de pacientes (Total:67) (n)	Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)	Nº de Controles (Total:53) (n)	OR (95% CI)	P – value
L/L + C/C	67	15	52	-	-
L/L + C/T	76	17	59	1(0,42-2,36)	0,99
L/L + T/T	53	12	41	1,01(0,39-2,61)	0,97
L/L + (T/T + C/T)	86	19	67	0,98(0,42-2,27)	0,96
L/*2 + C/C	42	7	36	0,67(0,22-2,00)	0,43
L/*2 + C/T	51	9	42	0,74(0,27-2,03)	0,52
L/*2 + T/T	28	4	24	0,58(0,14-2,15)	0,36
L/*2 + (T/T + C/T)	53	13	50	0,9(0,36-2,25)	0,8
*2/*2 + C/C	30	7	23	1,06(0,34-3,25)	0,91
*2/*2 + C/T	39	9	30	1,04(0,37-2,92)	0,93
*2/*2 + T/T	16	4	12	1,16(0,27-4,70)	1
*2/*2 + (T/T + C/T)	51	13	38	1,19(0,47-3,02)	0,69

De acordo com a tabela 9, a presença de um único alelo polimórfico de IL6 (GC) combinada ao genótipo selvagem de IL1RN (LL), já mostra significância estatística  $p=0,003$ . Já o alelo polimórfico de IL1RN (2\*), só apresenta significância estatística somente se associado ao genótipo heterozigoto de IL6 (GC)  $p=0,00019$  ou quando em dupla homozigose (2\*2\*)  $p=0,02$ .

**Tabela 9: IL1RN e IL6**

<b>Genótipos IL1RN + IL6</b>	<b>Nº de pacientes (Total:67) (n)</b>	<b>Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)</b>	<b>Nº de Controles (Total:53) (n)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P – value</b>
L/L + G/G	55	20	35	-	-
L/L + G/C	87	13	74	0,31(0,13-0,74)	0,003
L/L + C/C	54	11	43	0,45(0,17-1,15)	0,06
<b>L/L + (C/C + G/C)</b>	98	14	84	0,29(0,12-0,69)	0,0016
L/*2 + G/G	30	12	18	1,17(0,42-3,21)	0,74
L/*2 + G/C	62	5	57	0,15(0,05-0,49)	0,00019
L/*2 + C/C	29	3	26	0,2(0,04-0,83)	0,011
<b>L/*2 + (C/C + G/C)</b>	73	6	67	0,16(0,05-0,46)	0,00008
9					
*2/*2 + G/G	18	12	6	3,50(1,01-12,57)	0,02
*2/*2 + G/C	50	5	45	0,19(0,06-0,62)	0,001
*2/*2 + C/C	17	3	14	0,38(0,07-1,65)	0,14
<b>*2/*2 + (C/C + G/C)</b>	61	6	55	0,19(0,06-0,57)	0,00062

\* $p<0,05$  (estatisticamente significativa)

**Tabela 10: IL1RN E IL8**

Genótipos <i>ILRN + IL8</i>	Nº de pacientes (Total:6 7) (n)	Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)	Nº de Controles (Total:53) (n)	OR (95% CI)	P – <i>value</i>
L/L + A/A	67	13	54	-	-
L/L + A/T	77	18	59	1,27(0,53-3,08)	0,56
L/L + T/T	52	13	39	1,38(0,53-3,61)	0,46
L/L + (T/T+ A/T)	86	21	65	1,34(0,58-3,15)	0,45
L/*2 + A/A	42	5	37	0,56(0,16-1,89)	0,30
L/*2 + A/T	52	10	42	0,99(0,36-2,71)	0,98
L/*2 + T/T	29	5	24	0,87(0,24-3,02)	0,80
L/*2 + (T/T+ A/T)	61	13	48	1,13(0,44-2,80)	0,78
*2/*2 + A/A	30	5	25	0,83(0,23-2,89)	0,74
*2/*2 + A/T	40	10	30	1,38(0,49-3,89)	0,49
*2/*2 + T/T	15	5	10	2,08(0,51-8,27)	0,30
*2/*2 + (T/T+ A/T)	49	13	36	1,5(0,57-3,94)	0,36

O cruzamento de genótipos para IL1B e IL6 mostra que a presença de um único alelo polimórfico de IL6, seja o genótipo heterozigoto (GC), ou seja, o genótipo polimórfico (CC), traz significância estatística para qualquer combinação com IL1B, independente de seu genótipo, conforme a tabela 11. Somente nos casos em que houve o genótipo selvagem de IL6 (GG), não se verificou significância estatística.

**Tabela 11: *IL1β* e *IL6***

<b>Genótipos <i>IL1β</i> + <i>IL6</i></b>	<b>Nº de pacientes (Total:67) (n)</b>	<b>Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)</b>	<b>Nº de Controles (Total:53) (n)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b><i>P</i> – value</b>
<b><i>C/C</i> + <i>G/G</i></b>	36	15	21	-	-
<b><i>C/C</i> + <i>G/C</i></b>	68	8	60	0,19(0,06-0,56)	0,0004*
<b><i>C/C</i> + <i>C/C</i></b>	35	6	29	0,29(0,08-0,98)	0,02*
<b><i>C/C</i> + (<i>C/C</i> + <i>G/C</i>)</b>	79	9	70	0,18(0,06-0,52)	0,00021*
<b><i>C/T</i> + <i>G/G</i></b>	45	17	28	0,85(0,32-2,29)	0,72
<b><i>C/T</i> + <i>G/C</i></b>	77	10	67	0,21(0,07-0,59)	0,0006*
<b><i>C/T</i> + <i>C/C</i></b>	44	8	36	0,31(0,1-0,95)	0,02*
<b><i>C/T</i> + (<i>C/C</i> + <i>G/C</i>)</b>	88	11	77	0,2(0,07-0,55)	0,00029*
<b><i>T/T</i> + <i>G/G</i></b>	22	12	10	1,68(0,51-5,63)	0,34
<b><i>T/T</i> + <i>G/C</i></b>	54	5	49	0,14(0,04-0,49)	0,00029*
<b><i>T/T</i> + <i>C/C</i></b>	21	3	18	0,23(0,04-1,07)	0,03*
<b><i>T/T</i> + (<i>C/C</i> + <i>G/C</i>)</b>	64	6	59	0,14(0,04-0,46)	0,00011*

\* $p < 0,05$  (estatisticamente significativa)

**Tabela 12: *IL1 $\beta$*  e *IL8***

<b>Genótipos <i>IL1<math>\beta</math></i> + <i>IL8</i></b>	<b>N °de pacientes (Total:67) (n)</b>	<b>Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)</b>	<b>Nº de Controles (Total:53) (n)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P – value</b>
<b>C/C + A/A</b>	48	8	40	-	-
<b>C/C + A/T</b>	57	12	45	1,33(0,45-4,02)	0,56
<b>C/C + T/T</b>	33	8	25	1,6(0,47-5,49)	0,40
<b>C/C + (T/T+ A/T)</b>	67	16	51	1,57(0,56-4,49)	0,34
<b>C/T + A/A</b>	57	10	47	1,06(0,34-3,31)	0,90
<b>C/T + A/T</b>	67	15	52	1,44(0,51-4,16)	0,44
<b>C/T + T/T</b>	32	10	32	1,56(0,49-4,99)	0,39
<b>C/T + (T/T+ A/T)</b>	58	18	58	1,55(0,57-3,34)	0,34
<b>T/T + A/A</b>	34	5	29	0,86(0,22-3,33)	0,81
<b>T/T + A/T</b>	44	10	34	1,47(0,47-4,68)	0,46
<b>T/T + T/T</b>	10	5	14	1,79(0,42-7,50)	0,36
<b>T/T + (T/T+ A/T)</b>	53	13	40	1,63(0,55-4,87)	0,33

Observando a tabela 13, a respeito da combinação de genótipos de *IL6* e *IL8*, nota-se que a combinação do genótipo selvagem de *IL6* (GG) combinado a qualquer genótipo de *IL8* não possui p significativo, mas quando o genótipo heterozigoto de *IL6* (GC) está combinado a qualquer genótipo de *IL8* este apresenta p significativo. Nota-se ainda que a combinação do genótipo polimórfico de *IL6* (CC) combinado ao genótipo selvagem de *IL8* (AA) apresenta p=0,014, assim como a combinação do genótipo polimórfico de *IL6* (CC) com o modelo recessivo de *IL8* (AA + AT) apresenta p=0,03.

**Tabela 13: IL6 e IL8**

<b>Genótipos IL6+IL8</b>	<b>Nº de pacientes (Total:67) (n)</b>	<b>Nº de pacientes com LCCG (Total:14) (n)</b>	<b>Nº de Controles (Total:53) (n)</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>P – value</b>
<b>G/G + A/A</b>	36	13	23	-	-
<b>G/G + A/T</b>	46	18	28	1,59(0,57-4,50)	0,32
<b>G/G + T/T</b>	21	13	8	2,88(0,83-10,24)	0,059
<b>G/G + (T/T+ A/T)</b>	55	21	34	1,09(0,42-2,86)	0,84
<b>G/C + A/A</b>	68	6	62	0,17(0,05-0,56)	0,00061*
<b>G/C + A/T</b>	78	11	67	0,29(0,1-0,81)	0,0073*
<b>G/C + T/T</b>	53	6	47	0,23(0,07-0,75)	0,005*
<b>G/C + (T/T+ A/T)</b>	87	14	73	0,34(0,13-0,9)	0,01*
<b>C/C + A/A</b>	35	4	31	0,23(0,05-0,89)	0,014*
<b>C/C + A/T</b>	45	9	36	0,44(0,14-1,33)	0,105
<b>C/C + T/T</b>	20	4	16	0,44(0,1-1,85)	0,2
<b>C/C + (T/T+ A/T)</b>	54	12	42	0,51(0,18-1,42)	0,14

\*p<0,05 (estatisticamente significativa)

#### 4.DISCUSSÃO

Na presente análise, foram escolhidos genes da resposta imune que codificam proteínas que possam ser componentes na patogênese da LCCG. Isso porque, em doenças de patogênese inflamatória, polimorfismos funcionais em genes de citocinas podem confirmar diferenças na síntese de secreção de proteínas<sup>18,22</sup>. Mesmo considerando a pequena amostra em estudo, foi possível observar que *IL6* oferece uma relação de proteção a LCCG. Neste trabalho, foi investigada a relação entre polimorfismos de *IL1B -511C/T*, *IL1RN (VNTR)*, *IL6 -174 G/C* e *IL8 -251 A/T*, não vistas anteriormente em outras pesquisas relacionadas a essa patologia, reforçando o ineditismo deste estudo.

Considerando a amostra desse estudo, obtivemos predominantemente pacientes do sexo feminino (71,42%), com idades variando entre a primeira e terceira décadas de vida (mediana de 22 anos) assim como vemos essa predominância na literatura<sup>3,6</sup>, mas em relação a localização, obtivemos lesões em número igual na maxila e mandíbula em discordância com a literatura, em que a prevalência dos casos possui localização na mandíbula<sup>11</sup>.

Nossos resultados indicaram que somente a *IL6* apresentou resultado significativo, quando avaliada de forma isolada, indicando ainda uma característica protetora à LCCG. A análise estatística aponta que o alelo polimórfico dessa interleucina está relacionado proteção à doença. Isso é visualizado uma vez que o genótipo heterozigoto de *IL6 (G/C)* é encontrado numa frequência de 21,4% em pacientes com LCCG e em 77,4% em pacientes do grupo controle ( $p=0,0000005$ ). Constata-se assim a característica dominante desse alelo polimórfico através da estatística feita para o modelo dominante ( $C/C + G/C$ ) entre LCCG e população, com  $p= 0,0000002$  e frequências de 28,67% e 96,22%, respectivamente.

Essa referida proteção à lesão do genótipo polimórfico de *IL6*, é vista por sua função crítica na resposta inflamatória de LCCG, assim como apontam estudos que essa IL é regulada pela sua própria expressão, além de ser capaz

de regular outras citocinas pró-inflamatórias<sup>23</sup>. Além disso, sua característica multifuncional é fundamentada pela sua presença nos mais variados tecidos inflamatórios e pela diversidade da sua produção por diversas células. Dentre essas células, os osteoclastos são estimulados em sua formação por essa IL e são apontados como importantes na função da reabsorção óssea, dessa forma, influenciando na severidade de doenças inflamatórias<sup>21</sup>. Isso pôde ser observado na análise entre os grupos agressivo de LCCG e o grupo controle para o genótipo heterozigoto (G/C),  $p=0,000024$ ; e polimórfico (C/C)  $p=0,0007$  e entre os grupos não agressivo e controle para o genótipo heterozigoto(G/C)  $p=0,00065$ . A ausência de significância entre os grupos não agressivo e agressivo da lesão para esta interleucina pode ser justificada pela pequena amostra obtida da lesão em estudo

A complexidade das doenças, assim como os variáveis polimorfismos genéticos que podem influencia-las em sua prevalência e severidade, dificultam análises isoladas de polimorfismos devido a provável ocorrência de associações entre eles. Nesse estudo, também foi realizado a análise das IL's de forma associada. Quando analisadas duas a duas, as interleucinas associadas com *IL6* mostraram-se significativas. É conhecido que o sinergismo de *IL1* e *IL6* possam influenciar na iniciação de tumores, assim como no seu crescimento e aceleração da resposta inflamatória<sup>20</sup>. Em nosso estudo, encontramos associação significativa entre *IL6* e *IL1RN*, *IL1b* e *IL8*.

*IL1b* e *IL1RN* são duas das três citocinas da família IL1, sendo *IL1b* agonista e *IL1RN* antagonista. Uma das citocinas pró-inflamatórias candidatas associadas à severidade de LCCG é a *IL-1 $\beta$* , que afeta a maioria das células e está envolvida em casos de imunidade, sepse, infecção e inflamação. Opostamente, a IL-1RA age como um agente anti-inflamatório que inibe a ação de IL-1<sup>19,22</sup>. Um dos mais importantes polimorfismos genéticos no gene *IL 1RN* é o número variável de repetições em tandem (VNTR, repetições de 86 pb) no intron 2. O alelo curto com duas repetições (*IL 1RN C*) tem sido associado com o resultado clínico mais grave em várias doenças crônicas inflamatórias<sup>23,25</sup>. Como o alelo curto interfere na expressão de *IL 1RN* e na resposta inflamatória ainda não foi claramente elucidado. Por outro lado, os alelos longos (*IL 1RN L*)

com três ou mais repetições parecem promover uma resposta imune normal<sup>26</sup>. *IL 1B* é um gene altamente polimórfico. Alguns dos seus polimorfismos são responsáveis pelas alterações nos níveis de IL-1, que podem ser relevantes para o risco de doença inflamatória. O polimorfismo na região promotora - 511C> T está associado com um aumento da secreção de IL-1 $\beta$ <sup>18,30</sup>.

O equilíbrio entre *IL-1* e *IL-1Ra* nos tecidos influencia o desenvolvimento e a intensidade das doenças inflamatórias. IL1-Ra é produzido primeiramente por monócitos e macrófagos, mas pode ser sintetizado por qualquer célula que produza *IL-1*, tais como neutrófilos, hepatócitos ou células microgliais<sup>18,19</sup>. Um aumento da secreção de IL-1Ra a partir de células mononucleares está relacionado com a artrite reumatoide e a tuberculose na presença do alelo *IL1RN C*. Por outro lado, estudos em pacientes com colite ulcerosa e outras doenças inflamatórias do intestino demonstram uma menor quantidade de *IL-1Ra* e um nível reduzido de *IL 1RN* na mucosa do cólon de células portadoras de *IL 1RN C*<sup>29</sup>. Sabe-se que a IL-1Ra é um regulador chave da IL-1. Na verdade, em todos esses estudos, os níveis de *IL-1* foram muito altos e a gravidade da resposta imune inflamatória parecia estar ligada a uma relação de *IL-1Ra / IL-1 $\beta$*  inferior<sup>30</sup>. No entanto, resultados controversos podem estar relacionados a diferentes doenças em populações específicas.

Nossos resultados mostraram que a associação de *IL6* com as outras IL's apresentaram significância estatística quando o genótipo heterozigoto de *IL6* (G/C) está presente na associação, independente do genótipo da outra interleucina. Isso nos reitera o caráter dominante do polimorfismo de *IL6* e sua influência na expressão de outras citocinas. Esse sinergismo pode resultar do fato que o polimorfismo de *IL6* pode induzir IL1Ra de forma que esta última interfira na baixa concentração de *IL1b*<sup>21,24</sup>. Uma vez que IL1RN encontra-se ligado ao receptor de *IL1b*, ocorre o decréscimo da concentração deste no plasma, reduzindo os efeitos inflamatórios. Foi observado em pacientes portadores de artrite reumatoide e em estudos do sinergismo dessas IL's em processos inflamatórios e câncer, reguladores da severidade da doença<sup>21</sup>.

Quando se tem o genótipo polimórfico de *IL6*, observa-se que somente algumas associações genéticas específicas com outras interleucinas são significantes. Isso pode ser explicado pela baixa frequência de genótipos polimórficos de *IL6* na amostra em pacientes com lesão do grupo controle. Essas interações de interleucinas podem desempenhar uma função de controle na atividade celular de diferentes populações de células (multinucleares, monócitos/ fibroblastos) possivelmente contribuindo para os mecanismos de severidade inflamatória e ocasionalmente osteólise<sup>21,21,24</sup>.

Outra associação significativa observada nesse estudo ocorreu entre *IL6* e *IL8*. O gene *IL8*, localizado no cromossomo 4, exibe um SNP A/T -251. O alelo A tende a ser associado com uma produção aumentada de *IL8* com amplificação da resposta inflamatória, assim como foi observado em estudos de câncer gástrico<sup>17,20</sup>. Não foram encontrados estudos prévios analisando a associação dessas duas IL's para LCCG, assim como para as outras interleucinas desse trabalho, sendo assim inédita esta investigação de associação de interleucinas para essa patologia oral. O estudo cada vez mais aprofundado dessas associações deve ser estimulado em busca de respostas ainda mais consistentes.

## 5. CONCLUSÃO

Por fim, o presente trabalho mostrou a importância do alelo polimórfico de *IL6* na condição de proteção à LCCG. Assim como associações significativas de *IL6* com o polimorfismo de *IL1B -511C/T*, *IL1RN (VNTR)* e *IL8 -251 A/T*. O estudo também demonstra resultados que indicam que as citocinas podem ter um papel na melhor compreensão da patogênese e severidade da LCCG, seja em sua variante agressiva e não agressiva, além de contribuir para a compreensão da susceptibilidade genética. No entanto, novos estudos com uma maior casuística abordando essas e outras interleucinas devem ser realizados a fim de melhor estabelecer essas correlações.

## 6. REFERÊNCIAS

1. Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. **Lyon: IARC Publishing Group; 2005**
2. Choung, R., Kaban, L.B., Kozakewich, H., Perez-Atayde, A. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg**, 1986 Sep; 44(9):708-13.
3. De Lange, J., Van Den Akker, H.P. Clinical and radiological features of central giant-cell lesions of the jaw. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2005; 99:464-70
4. Flórez-Moreno GA, Henao-Ruiz M, Santa-SáenzDM, Castañeda-PeláezDA, Tobón-Arroyave SI. Cytomorphometric and immunohistochemical comparison between central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2008;105:625-32
5. Itonaga I, Hussein I, Kudo O, SabokbarA, Watt-Smith S, Ferguson D, AthanasouNA. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. **J Oral Pathol Med** 2003; 32: 224-31
6. Kruse-Losler, B., Diallo, R., Gaertner, C., Mischke, KL., Joos, U., Kleinheinz,J. Central giant cell granuloma of the jaws: A clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006;101:346-54
7. Liu, B., Yu, S.F., Li, T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J Oral Pathol Med** 2003; 32: 367–375.
8. Nishitani, H., Lyegerou, Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. **Genes Cells** 2002;7:523-34.

9. Rawashdeh, M.A., Bataineh, A.B., Al-Khateeb T. Long-term clinical and radiological outcomes of surgical management of central giant cell granuloma of the maxilla. *Int.J.OralMaxillofac. Surg.* 2006; 35: 60–66 SADIQ Z, GOODGER NM. Calcitonin-induced osteoplastic reaction in the mandible. **J Oral Maxillofac Surg.** 2011 Oct;49(7):578-9. Epub 2010 Sep 21.
  
10. Tobón- Arroyave S.I., Franco, G.L.M., Guaman D.M, Floréz G.A., Bravo V.T., Castaneda, D.A., Vieco, D.B. Immunohistochemical expression of RANK, GRa and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. **Oral Oncology** 2005; 41, 480–488
  
11. Vered M, Buchner A, Dayan D. Immunohistochemical expression of glucocorticoid and calcitonin receptors as a tool for selecting therapeutic approach in central giant cell granuloma of the jaw-bones. **Int J Oral MaxillofacSurg** 2006; 35: 756–760.
  
12. Vered M., Shoat I., Buchner A., Dayan D., Taicher S. Calcitonin nasal spray for treatment of central giant cell granuloma: Clinical, radiological, and histological findings and immunohistochemical expression of calcitonin and glucocorticoid receptors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2007;104:226-39
  
13. Neville, B.W.;Allen,C.M.; Damm,D.D.;et al. *Patologia: Oral &Maxilofacial*. 2ª Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
  
14. Regezi, J.A.; Sciubba, J.J.; Pogrel, M.A. *Atlas de Patologia Oral e Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000
  
15. Kauzman A1, Li SQ, Bradley G, Bell RS, Wunder JS, Kandel R. Central giant cell granuloma of the jaws: assessment of cell cycle proteins. **J Oral Pathology Med.** 2004 Mar;33(3):170-6.
  
16. Gregghi, C.L.A. Avaliação quantitativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e do TGF-B, presentes na saliva de pacientes com periodontite, antes e após a

- submissão a psicoterapia – Análise comparativa com pacientes controles. Tese (Livre-Docência). Universidade de São Paulo. Bauru, 2011.
17. Dirschnabel AJ, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Bernardino JF, Rosa EAR, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon. **Clin. Oral Impl. Res.** 22, 2011; 1235–1241.
  18. Nosratollah E., N., Nikbin, B., Amirzargar, A., Nazhvani, A.D., Shakiba, Y. Gene polymorphism of interleukin-1 alpha and beta in keratocystic odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med** (2012) 41: 697–701.
  19. Brarboza, F.C. Associação dos Polimorfismos em Genes de Interleucinas (IL1B -511, IL1RN, IL6 -174G e IL8 -251) com Lesões Gástricas Relacionadas ao *Helicobacter pylori*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.
  20. Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R. et al, Novel polymorphisms in the interleukin-6 gene: their effect on IL-6 transcription, plasma IL-6 levels and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J. Clin. Invest.** 1998;102:1369–1376.
  21. Blakemore AI, Tarlow MJ, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 1994; 37: 1380–1385.
  22. Papanicolaou, P., Chrysomali, e., Stylogianni, E., Donta, C., Vlachodimitropoulos, D. Increased TNF-alfa, IL-6 and decreased IL-1beta immunohistochemical expression by the stromal spindle-shaped cells in the central giant cell granuloma of the jaws. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal**, [s.l.], p.56-62, 2012
  23. Buchs N, Di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **Genes Immun.** 2001; 2(4): 222-228.
  24. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW. Novel genetic association between ulcerative colitis

- and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. **Gastroenterology**. 1994; 106: 637-642.
25. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Potential influence of interleukin-1 haplotype IL-1 $\beta$  -511\*T-IL-1RN\*1 in conferring low risk to middle third location of esophageal cancer: A case-control study. **Human Immunology**. 2008; 69:179-186.
26. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, van de Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**. 2011; 128(4): 739. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.050.
27. Barksby HE, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **ClinExp Immunol**. 2007; 149(2): 217-225.
28. Kamenarska Z, Dzhebir G, Hristova M, Savov A, Vinkov A, Kaneva R, Mitev V, Dourmishev L. IL-1RN VNTR Polymorphism in Adult Dermatomyositis and Systemic Lupus Erythematosus. **Dermatology Research and Practice**. 2014; 2014: 1-5.
29. Allam I, Djidjik R, Ouikhlef N, Louahchi S, Raaf N, Behaz N, Abdessemed A, Khaldoun N, Tahiat A, Bayou M, Ladjouze-Rezig A, Ghaffor M. Interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms study in patients with rheumatoid arthritis. **PatholBiol (Paris)**. 2013; 61(6): 264-8. doi: 10.1016/j.patbio.2013.05.005. Epub 2013.
30. Cauci S, Santolo M, Ryckman KK, Williams SM, Banfi G. Variable number of tandem repeat polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist gene IL-1RN: a novel association with the athlete status. **BMC Med Genet**. 2010;
31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**. 1988 Feb 11; 16(3): 121

## ANEXO



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ**

**UNIVERSIDADE DE FORTALEZA**

**VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO DA PESQUISA: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO GENÉTICO EM  
LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES**

**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: RAFAEL LIMA VERDE OSTERNE**

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO GENÉTICO EM LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES**. O motivo que nos leva a estudar o problema é compreender como ocorre a Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) e o motivo de comportamento clinic diferente entre pacientes. O objetivo desse verificar a associação entre a presença de polimorfismos genéticos (IL8 -251A>T, IL6 -174G>C e TNFA-308G>A) e a agressividade da LCCG. Para esta finalidade, sera necessária a coleta de sangue, que sera depositado e armazenato exclusivamente para a utilização na presente pesquisa.

**1.PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:** Ao participar desta pesquisa será realizado um procedimento de coleta de 5ml de sangue para avaliação da presença de polimorfismos genéticos.

Lembramos que o sangue será coletado, depositado, armazenado e utilizado exclusivamente na presente pesquisa. A sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado a avaliação sem nenhum prejuízo para você.

**2.RISCOS E DESCONFORTOS:** O desconforto existente é a coleta de sangue como para um exame de sangue de rotina, entretanto se justifica pelo benefício de aquisição do conhecimento sobre a LCCG.

**3.BENEFÍCIOS:** Os benefícios esperados com a pesquisa são sobre a etiopatogênese (formação) da LCCG e motivos pela diferença do comportamento em diferentes pacientes. Desta forma tratamentos direcionados poderiam ser elaborados.

**4.FORMAS DE ASSISTÊNCIA:** Se você precisar de alguma orientação por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou se o pesquisador descobrir que você tem alguma coisa que necessite de tratamento, você será avaliado no Curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza Avenida Washington Soares, 1321 - Edson Queiroz.

**5.CONFIDENCIALIDADE:** Todas as informações que o(a) Sr.(a) nos fornecer serão utilizadas somente para esta pesquisa. Suas respostas ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em nenhum lugar do questionário nem quando os resultados forem apresentados.

**6.ESCLARECIMENTOS:** Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: Rafael Lima Verde Osterne

Telefone para contato: (85) 999281718

Horário de atendimento: Segundas-feiras às sextas-feiras das 8h-18h

Se desejar obter informações sobre os seus direitos e os aspectos éticos envolvidos na pesquisa poderá consultar o Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza, Ce.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos "C COÉTICA

Universidade de Fortaleza.

Av. Washington Soares, 1321, Bloco da Reitoria, Sala da Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 1º andar.

Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-341.

**7.RESSARCIMENTO DAS DESPESAS:** A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

**8.CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO:** Se o(a) Sr.(a) estiver de acordo em participar deve preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós-esclarecido que se segue, e receberá uma via deste Termo e a outra ficará com o pesquisador.

O **participante de pesquisa** ou seu representante legal, quando for o caso, deve rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido "C TCLE "C apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O **pesquisador responsável** deve, da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido "C TCLE "C apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

### **CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) \_\_\_\_\_, portador(a) da cédula de identidade \_\_\_\_\_, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa, autorizando ainda a coleta, depósito, armazenamento e utilização de seu material biológico (sangue) para a presente pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

Fortaleza-Ce., \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do participante ou Representante Legal

Impressão dactiloscópica

---

Assinatura do Pesquisador