

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Fabíola David Nunes

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *IL1A* (-889) E *IL1B* (+3954) EM
PACIENTES COM GRANULOMA PIOGÊNICO BUCAL**

Belo Horizonte
2012

Fabíola David Nunes

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NOS GENES *IL1A* (-889) E *IL1B* (+3954) EM
PACIENTES COM GRANULOMA PIOGÊNICO BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínicas Odontológicas – Ênfase: Estomatologia.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

N972a Nunes, Fabíola David
Análise de polimorfismos nos genes *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954) em pacientes com granuloma piogênico bucal / Fabíola David Nunes. Belo Horizonte, 2012.
43f.: il.

Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Interleucina-1 alfa. 2. Interleucina -1 beta. 3. Granuloma piogênico. 4. Polimorfismo (Genética). I. Souza, Paulo Eudardo Alencar de. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.311.2

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao meu orientador Paulo Eduardo Alencar de Souza por todo o seu empenho, dedicação ao ensino e principalmente por tornar este momento possível.

Aos alunos de Iniciação Científica Clarisse Galvão e Gustavo Motta pelo auxílio na realização dos experimentos.

À professora Paula Rocha Moreira pela colaboração valiosa na análise dos resultados de eletroforese e nas análises estatísticas.

Ao professor Martinho Campolina Rebello Horta pelo auxílio nas análises estatísticas e pelo exemplo de professor.

Aos pacientes que se dispuseram a participar desta pesquisa.

Aos professores da disciplina de Estomatologia: Prof. Carlos Martins e Profa. Helenice Marigo, que estiveram conosco no dia a dia e estavam sempre dispostos a ensinar.

À minha querida amiga Liana Cristina Melo Carneiro Costa que me deu muita força não só nos assuntos relativos ao mestrado, mas também na vida pessoal. Por sua tranquilidade, generosidade e carinho têm toda a minha admiração.

Em especial:

A Deus por me guiar e permitir tamanha realização;

À minha família, em especial à minha mãe e meu marido que me apoiaram em todos os momentos.

Às minhas amigas-irmãs, que com suas palavras me deram muita força e fé.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperanças nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. É agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O granuloma piogênico (GP) é uma lesão relativamente comum na boca, caracterizada por intensa proliferação de células endoteliais associada a um infiltrado inflamatório. Sua etiopatogênese ainda não é totalmente conhecida e alguns autores sugerem que fatores irritativos locais como acúmulo de placa, de cálculo dental e traumatismos, além de fatores hormonais, possam estar associados ao desenvolvimento do GP. Embora a maioria da população apresente esses fatores irritativos na boca, uma minoria desenvolve o GP. A interleucina-1 é uma das principais citocinas envolvidas nas respostas inflamatórias, estimulando o recrutamento de leucócitos do sangue e a produção de fatores angiogênicos, como o VEGF, envolvidos na proliferação endotelial no GP. Polimorfismos funcionais em genes de citocinas podem predispor indivíduos ao desenvolvimento de doenças por meio da estimulação de processos inflamatórios. O objetivo deste estudo foi investigar associações de polimorfismos nos genes *IL1A* e *IL1B* e a ocorrência de GP bucal. DNA genômico foi obtido de raspados de mucosa bucal ou tecidos incluídos em parafina de 84 indivíduos com GP e 89 sem GP (grupo controle) e amplificado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos para os *locus* -889 de *IL1A* e +3954 de *IL1B*. Produtos de PCR foram submetidos à digestão com endonucleases de restrição e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida para distinção entre os alelos C e T, permitindo a determinação dos genótipos e detecção dos polimorfismos. As distribuições dos genótipos e dos alelos T para os genes *IL1A* e *IL1B* não foram significativamente diferentes entre os grupos GP e controle. Além disso, não houve associações de genótipos com localização do GP ou com existência de recorrências das lesões. Nossos dados sugerem que os polimorfismos -889 no gene *IL1A* e +3954 no gene *IL1B* não podem ser identificados como fatores de susceptibilidade à ocorrência do granuloma piogênico bucal em indivíduos brasileiros.

Palavras-chave: Interleucina-1 alfa. Interleucina-1 beta. Granuloma piogênico bucal. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Pyogenic granuloma (PG) is a common oral lesion characterized by dense endothelial proliferation associated with inflammatory cell infiltrate. Its etiopathogenesis is until not completely understood. Although some authors suggest that the lesion arises in response to low-grade local irritation, traumatic injury or hormonal factors, the majority of people that show these factors do not develop oral GP. Interleukin-1 is an important inflammatory cytokine that stimulates leukocyte recruitment to inflammatory sites and production of potent angiogenic factors, as VEGF, that are involved in GP development. Functional polymorphisms in cytokine genes can predispose individuals to disease by enhancing inflammatory process. The aim of this study was investigate the associations of the *IL1A* and *IL1B* gene polymorphisms with oral GP occurrence. Genomic DNA was obtained from oral swabs or paraffin-embedded tissues of 84 individuals with GP and 89 without GP (control group) and amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers flanking the *locus* -889 of *IL1A* and +3954 of *IL1B*. PCR products were submitted to restriction endonucleases digestion and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, to distinguish alleles C or T, allowing for determination of the genotypes and detection of the polymorphisms. The distributions of genotypes and frequencies of T allele for *IL1A* and *IL1B* genes were not significantly different between GP and control groups. Moreover, there was not association between genotypes and GP location or recurrence. Our data suggest that the polymorphism in the *IL1A* gene at position -889 and *IL1B* gene at position +3954 could not be identified as susceptibility factors for oral pyogenic granuloma in a sample of Brazilian individuals.

Key words: Interleukin-1 alpha. Interleukin-1 beta. Oral pyogenic granuloma. Gene polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Granuloma piogênico	15
1.2 Interleucina-1	17
1.3 Papel da interleucina-1 na angiogênese.....	19
1.4 Polimorfismos genéticos.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específico.....	23
3 ARTIGO	24
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Granuloma piogênico

O granuloma piogênico (GP) é uma lesão relativamente comum na boca, ocorrendo também em outras regiões como pele leito ungueal e da face, além de outras mucosas. Sua etiologia é incerta e alguns autores acreditam que a ação de fatores irritativos locais de baixa intensidade como cálculo subgengival, acúmulo de placa, impactação de alimentos, restaurações mal adaptadas e mordedura de tecidos moles pode desencadear o surgimento da lesão (BHASKAR; JACOWAY, 1966; AL-KHATEEB; ABABNEH, 2003). A maioria das lesões de GP ocorre na gengiva, mas mucosa jugal, língua, lábio, palato e fundo de saco de vestibulo podem também ser acometidos (BHASKAR; JACOWAY, 1966; KFIR et al., 1980). Embora o GP possa se desenvolver em qualquer idade, é mais comum em crianças e adultos jovens (JAFARZADEH et al., 2006).

Estudos epidemiológicos indicam que o GP é mais comum em mulheres do que em homens (ANGELOPOULOS, 1971), sugerindo que alterações hormonais possam constituir fatores predisponentes ao surgimento das lesões (DALEY et al., 1991). Cerca de 5% das mulheres grávidas desenvolvem GP na gengiva e, por isso, essa lesão tem sido denominada de granuloma gravídico (SILLS et al., 1996). As alterações hormonais presentes na gravidez podem predispor a uma resposta mais exacerbada do organismo a irritações e, dessa forma, o acúmulo de placa e a inflamação gengival seriam suficientes para que as alterações hormonais subclínicas induzissem a formação de lesões (SOORIYAMOORTHY et al., 1989). Essas lesões frequentemente tendem a recidivar quando excisadas ainda durante a gravidez (TUMINI et al., 1998). Alguns mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e regressão do granuloma gravídico têm sido amplamente estudados. As alterações hormonais na gravidez estão associadas com alterações na função e estrutura da microvasculatura sanguínea e linfática da pele e mucosas (HENRY et al., 2006). Estrógeno eleva a produção de diversos fatores de crescimento como fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), fator de crescimento transformante-beta 1 (TGF- β 1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), estimulando a angiogênese e a formação de tecido de granulação (KANDA; WATANABE, 2005). Yuan e colaboradores, em 2002, observaram que

hormônios esteroidais femininos aumentam a expressão de fatores angiogênicos, como FGFb e VEGF, em células obtidas de granuloma gravídico e inibem a apoptose nessas células.

Clinicamente, observa-se nódulo sésil ou pediculado, de coloração avermelhada, consistência variando de macia a firme, tamanho variando de poucos milímetros a vários centímetros, podendo apresentar áreas de ulceração cobertas por membrana fibrino-purulenta (ANGELOPOULOS, 1971; JAFARZADEH et al., 2006). Por acometer tecidos moles, o GP raramente apresenta imagem radiográfica (NEVILLE et al., 1998). As lesões são geralmente indolores e o sinal clínico mais evidente é o sangramento ao toque ou a traumatismos leves (ANGELOPOULOS, 1971).

Diagnóstico diferencial pode ser feito com lesão periférica de células gigantes, fibroma ossificante periférico, hemangioma, metástases de neoplasias malignas, linfomas, neoplasias malignas vasculares. As características histopatológicas observadas no fragmento de biópsia permitirão estabelecimento do diagnóstico definitivo (JAFARZADEH et al., 2006).

Histologicamente observa-se na lâmina própria exuberante tecido de granulação e proliferação de células endoteliais formando agregados lobulares e espaços vasculares preenchidos por hemácias. É evidente um infiltrado inflamatório misto, rico em neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (NEVILLE et al., 1998; JAFARZADEH et al., 2006). Embora o componente inflamatório esteja presente em praticamente todas as lesões em íntimo contato com as células endoteliais, não há estudos na literatura sobre a caracterização fenotípica e funcional desse infiltrado, nem sobre as citocinas produzidas e sua relação com angiogênese e crescimento da lesão.

Yuan e colaboradores (2000) avaliaram, através de reações de imunoistoquímica, a expressão de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos em fragmentos de gengiva sadia, gengiva com periodontite e gengiva com GP. Seus resultados revelaram expressão significativamente maior dos fatores angiogênicos (VEGF e FGFb) e menor expressão do fator anti-angiogênico angiostatina no GP, quando comparado à gengiva sadia ou com periodontite, sugerindo que um desequilíbrio entre os fatores controladores da angiogênese possa estar envolvido na patogênese do GP. Bragado e colaboradores (1999) detectaram elevada expressão imunoistoquímica do VEGF em amostras de GP nas áreas de células

endoteliais em proliferação, sem formação de lúmen vascular. A expressão de VEGF foi significativamente menor nos vasos com lúmen bem formados, sugerindo que a produção de VEGF possa ser predominante nas células endoteliais precursoras ou imaturas durante o desenvolvimento do GP. A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também está aumentada nas células endoteliais e nas células estromais do GP, sugerindo participação na angiogênese e crescimento do GP (SHIMIZU et al., 1998).

O tratamento do GP consiste na excisão cirúrgica, além da remoção de possíveis fatores irritativos locais como placa bacteriana, cálculo e restaurações mal adaptadas (NEVILLE et al., 1998; JAFARZADEH et al., 2006). Ocasionalmente, as lesões recidivam e são necessárias reexcisões. Em raras situações, têm sido observadas múltiplas recidivas (NEVILLE et al., 1998). Utilização de criocirurgia ou laser Nd:YAG e injeção de etanol absoluto também têm sido descritas para tratamento de lesões recidivantes (JAFARZADEH et al., 2006).

1.2 Interleucina-1

Interleucina-1 (IL-1) representa uma família de duas citocinas agonistas, IL-1 α e IL-1 β , e uma antagonista, IL-1Ra, que são pleiotrópicas e afetam as respostas inflamatórias, imunológicas, a hematopoiese e a biologia óssea, além do crescimento e disseminação tumorais (APTE; VORONOV, 2002). Muitos tipos celulares produzem e secretam IL-1 α e IL-1 β e IL-1Ra, em resposta a microorganismos e seus produtos, citocinas, e outros estímulos do microambiente (DINARELLO, 1996; APTE; VORONOV, 2002). Células mononucleares secretam altos níveis de IL-1 α e IL-1 β , enquanto células não fagocitárias secretam pequenas quantidades de IL-1, principalmente IL-1 β (DINARELLO, 1996).

IL-1 α e IL-1 β se ligam ao mesmo receptor e exercem atividades biológicas semelhantes (DINARELLO, 1996). IL-1 β é ativa na forma secretada, enquanto IL-1 α é ativa na forma intracelular e quando ancorada à membrana celular (contato célula-célula). Intracelularmente, IL-1 α controla expressão gênica, proliferação e diferenciação celular e quando expressa na membrana plasmática atua como estimulador imunológico (APTE; VORONOV, 2002). A principal forma secretada (IL-1 β), em baixas doses teciduais, induz resposta inflamatória local seguida de ativação

da imunidade protetora, enquanto em altas doses causa inflamação acompanhada de dano tecidual e efeitos sistêmicos, além de induzir invasão tumoral (revisado por APTE; VORONOV, 2002). Essas citocinas se ligam principalmente ao receptor do tipo I (IL-1RI) para induzirem seus efeitos biológicos. Por outro lado, a forma antagonista IL-1Ra se liga aos receptores de IL-1 (IL-1R), expresso por muitos tipos celulares, sem transmitir sinais de ativação, funcionando como um inibidor fisiológico (APTE; VORONOV, 2002).

Juntamente com o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 α e IL-1 β são secretadas por macrófagos e iniciam o processo inflamatório, diretamente e por meio da indução de genes pró-inflamatórios, como os da ciclooxygenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase indutível (iNOS), IL-6 e diversas outras citocinas e quimiocinas (DINARELLO, 1996; STYLIANOU; SAKLATVALA, 1998). Dessa forma, a rápida ativação de leucócitos e células estromais gera grandes quantidades de prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico, outras citocinas, além dos próprios IL-1 e TNF- α . Outro importante efeito de IL-1 e TNF- α é a estimulação da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, a qual promove o recrutamento de leucócitos do sangue para os sítios de inflamação (DINARELLO, 1996; STYLIANOU; SAKLATVALA, 1998).

IL-1 tem diversos efeitos na resposta imune adaptativa, controlando a proliferação, diferenciação e função de células matadoras naturais (NK), macrófagos, granulócitos, linfócitos T e B. Participa ativamente da diferenciação de linfócitos T auxiliares em T_H1 e T_H2, controlando a ativação das respostas imunes celular e humoral nos órgãos linfoides secundários. Através do estímulo para produção de fatores estimuladores de colônia (CSF), IL-1 promove a hematopoiese na medula óssea (DINARELLO, 1996; STYLIANOU; SAKLATVALA, 1998).

IL-1 está associada a angiogênese e crescimento de diversas neoplasias malignas de mama, pulmão, pâncreas, e estudos mostram que o uso de bloqueadores específicos de IL-1 β é capaz de inibir o crescimento tumoral (SCHMID et al., 2011). Em modelos experimentais, IL-1 constitui fator promotor da invasão tumoral em diversos tipos de neoplasias malignas, ao induzir a secreção de metaloproteinasas de matriz e fatores angiogênicos pelas células estromais e pelas próprias células do parênquima tumoral (APTE; VORONOV, 2002).

1.3 Papel da interleucina-1 na angiogênese

Durante a inflamação crônica, diversos mediadores controlam os processos de fibrose e de angiogênese, os quais caracterizam morfológica e funcionalmente as lesões. A angiogênese consiste na proliferação de células endoteliais com formação de novos vasos, sendo um componente comum de diversos mecanismos patológicos, incluindo crescimento tumoral, metástases e doenças articulares inflamatórias (FERRARA et al., 1992; BRENCHLEY, 2000). Este fenômeno ocorre em condições fisiológicas e patológicas permitindo maior acesso de leucócitos para sítios de lesão, assim como suprimento de nutrientes e oxigênio para o tecido inflamado (JOHNSON et al., 1999).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos mais potentes fatores angiogênicos e o principal regulador da proliferação endotelial, controlando ainda a permeabilidade vascular (FERRARA et al., 1992). Consiste em uma glicoproteína secretada por células endoteliais que potencializa o aumento da permeabilidade microvascular, induz a expressão de enzimas proteolíticas, estimula a proliferação de células endoteliais, assim como a migração de monócitos e osteoclastos (CONNOLLY, 1991; FERRARA et al., 1992; DVORAK et al., 1995; NAKAGAWA et al., 2000; SAKUTA et al., 2001).

Diversos estudos demonstraram o efeito estimulatório da produção de VEGF pelas citocinas IL-1 α e IL-1 β em diferentes tecidos e condições patológicas. Inoue e colaboradores, em 2005, verificaram que administração de IL-1 β estimula produção de VEGF e de MMP-3 por condrócitos e sinoviócitos em diferentes doenças articulares e que o tratamento com receptor inibidor IL-1ra reverte esse quadro. IL-1 α estimula produção de VEGF por células mesoteliais do pericárdio (HATAKEYAMA et al., 2007) e por células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (IMAIZUMI et al., 2000).

Salven e colaboradores, em 2002, mostraram que IL-1 α estimula a secreção de VEGF por células mononucleares de sangue periférico de maneira dose-dependente. Injeção subcutânea de IL-1 α , em camundongos, causa forte resposta angiogênica local por ativação de vias de sinalização relacionadas ao receptor VEGFR-2, acompanhada de infiltração de células inflamatórias produtoras de VEGF (SALVEN et al., 2002). Bando e colaboradores (2009) observaram que estimulação

in vitro de células do ligamento periodontal de humanos com IL-1 α induz a produção de VEGF e que esta via depende da produção de PGE₂ derivada da COX2, uma vez que a inibição de COX2 inibiu a expressão de VEGF. Além disso, IL-1 β estimula a proliferação, migração e adesão de células progenitoras endoteliais e aumenta a expressão de VEGF-A nessas células, de maneira dose-dependente (YANG et al., 2012).

1.4 Polimorfismos genéticos

Define-se polimorfismo genético como a ocorrência de múltiplos alelos num *locus*, no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% (THOMPSON et al., 1993). Entende-se por *locus* o local ocupado por um gene em um cromossomo e entende-se por alelo o gene correspondente de dois cromossomos homólogos. Por convenção, *loci* polimórficos são aqueles para os quais pelo menos 2% da população é heterozigota. Neste caso, levanta-se a hipótese de que algum fator seletivo atuou sobre aquele sistema genético, levando ao aumento da frequência do alelo anômalo (THOMPSON et al., 1993; BRASILEIRO-FILHO, 1998). Estas variações genótípicas podem ou não causar alterações na função do produto proteico (WORMHOUDT et al., 1999; MILLER et al., 2001).

Os polimorfismos têm valor, preferencialmente, pelo seu uso como “marcadores” genéticos para distinguir diferentes formas hereditárias de um gene em estudos de famílias (THOMPSON et al., 1993). Com as técnicas de DNA recombinante, tem sido possível detectar os polimorfismos que consistem, geralmente, em uma simples troca de base, deleções ou inserções casuais, ou na presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado fragmento de DNA (repetições em *tandem*). As técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos gênicos envolvem os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) e os polimorfismos de número variável em *tandem* (VNTRs). Os RFLPs são polimorfismos de ponto que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Como as enzimas de restrição têm sequências de reconhecimento específicas no DNA, as alterações da sequência do DNA genômico acarretam na criação ou na abolição de sítios de clivagem, alterando, desse modo, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA oriundos da ação da enzima de

restrição. Os RFLPs são detectados através da amplificação da região de interesse pela técnica da PCR e posterior tratamento com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos e originam fragmentos de DNA com comprimentos variados. Os RFLPs revelam polimorfismos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição (THOMPSON et al., 1993; OTTO et al., 1998).

O polimorfismo pode ocorrer não apenas na região de codificação da proteína (éxons), como também na região promotora do gene e assim, influenciar na quantidade de proteína expressada. Formas alélicas diferentes de um gene podem produzir uma proteína idêntica quando o polimorfismo não modifica o aminoácido; ou isoformas diferentes da proteína, quando modifica o aminoácido e conseqüentemente a composição da mesma (KINANE et al., 2005).

Alguns polimorfismos alteram a expressão e a função de genes, causando efeitos no fenótipo do indivíduo e conferindo assim, susceptibilidade a doenças (HART, 2002). Especificamente, diferentes formas de genes (variações alélicas) podem produzir variações na estrutura dos tecidos, nos mecanismos efetores das respostas imunes celular e humoral e nos níveis de mediadores inflamatórios produzidos. Enquanto o efeito de algumas variações alélicas pode ter significado clínico, o efeito de outras é provavelmente menor e sem significância clínica (KINANE et al, 2005; HART, 2003). Neste contexto, o conhecimento do genoma humano, associado às inúmeras pesquisas de polimorfismo genético de várias doenças imunes e inflamatórias, tem evidenciado a existência de uma base genética para a maioria das doenças (KINANE et al, 2005; HART, 2003).

Dessa forma, vários polimorfismos gênicos podem estar associados ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças e à severidade destas. A investigação e a caracterização de elementos específicos do risco podem proporcionar biomarcadores aplicáveis em diagnóstico e prognóstico estimando o risco em indivíduos de uma determinada população (KORNMAN et al., 1997).

Diversos estudos têm avaliado a existência de associação entre polimorfismos no gene *IL1* e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças humanas, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam de sua patogênese (DUTRA et al, 2009). As citocinas $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-1Ra$ são codificadas pelos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, respectivamente, os quais estão localizados no cromossomo 2 e são polimórficos em vários loci (revisado por DUTRA et al., 2009). A variação C/T foi descrita no promotor de *IL1A* (-889), estando o alelo

T associado a um aumento de quatro vezes na expressão de IL-1 α e o genótipo CC a menor atividade transcricional e menores níveis circulantes de IL-1 α , quando comparado ao TT (DOMINICI et al., 2002). O polimorfismo de nucleotídeo único C/T foi descrito no gene *IL1B* (+3954) e está associado com maior secreção de IL-1 β em indivíduos com genótipo TT (POCIOT et al., 1992).

Associações de doenças bucais com polimorfismos em genes de citocinas têm sido avaliadas principalmente na doença periodontal. Polimorfismos funcionais de *IL1* podem determinar um estado hiperinflamatório e aumentar a susceptibilidade à doença periodontal, uma vez que diversos estudos relatam associação entre o alelo T do polimorfismo -889 de *IL1A* e +3954 de *IL1B*, que determinam maior produção de citocinas, e ocorrência, forma clínica e intensidade da doença (revisado por DUTRA et al, 2009; revisado por LEE et al., 2012). Em modelo clínico de indução de gengivite por deficiência de higienização em humanos, foi observado que pacientes com polimorfismo funcional *IL1A* (+4845) e *IL1B* (+3954) com genótipo alto produtor de IL-1 α e IL-1 β (alelo T), apresentaram maiores níveis dessas citocinas no fluido crevicular (LEE et al., 2012).

Além da contribuição à compreensão da patogênese da doença periodontal, estudos de polimorfismos de genes de citocinas também podem ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos em outras doenças inflamatórias bucais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a ocorrência e a frequência dos polimorfismos -889C/T no gene *IL1A* e +3954C/T no gene *IL1B* em pacientes com granuloma piogênico bucal e em indivíduos não acometidos por essa lesão (grupo controle).

2.2 Específico

- a) Verificar se há associação entre esses polimorfismos e ocorrência do granuloma piogênico bucal.
- b) Verificar se há associação entre esses polimorfismos e a localização da lesão de granuloma piogênico (gengival ou extra-gengival).
- c) Verificar se há associação entre esses polimorfismos e a manifestação do granuloma piogênico (primitiva ou recorrente).

3 ARTIGO

Ausência de associação dos polimorfismos genéticos IL1A (-889) e IL1B (+3954) e o desenvolvimento do granuloma piogênico bucal.

Lack of association of the IL1A (-889) and IL1B (+3954) gene polymorphism with oral pyogenic granuloma.

Fabíola David Nunes, Clarice Ferreira Galvão, Gustavo de Freitas Motta, Rodrigo Villamarim Soares, Martinho Campolina Rebello Horta, Paulo Eduardo Alencar de Souza

Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Resumo

A interleucina-1 é uma das principais citocinas envolvidas nas respostas inflamatórias, estimulando o recrutamento de leucócitos do sangue e a produção de fatores angiogênicos, como o VEGF, envolvidos na proliferação endotelial que ocorre no granuloma piogênico (GP). Polimorfismos funcionais em genes de citocinas podem predispor indivíduos ao desenvolvimento de doenças por meio da estimulação de processos inflamatórios. O objetivo deste estudo foi investigar associações de polimorfismos nos genes *IL1A* e *IL1B* e a ocorrência de GP bucal. DNA genômico foi obtido de raspados de mucosa bucal ou tecidos incluídos em parafina de 84 indivíduos com GP e 89 sem GP (grupo controle) e amplificado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos para os *locus* -889 de *IL1A* e +3954 de *IL1B*. Produtos de PCR foram submetidos a digestão com endonucleases de restrição e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida para distinção entre os alelos C e T, permitindo a determinação dos genótipos e detecção dos polimorfismos. As distribuições dos genótipos e dos alelos para os genes *IL1A* e *IL1B* não foram significativamente diferentes entre os grupos GP e controle. Além disso, não houve associações de genótipos com localização do GP ou com existência de recorrências das lesões. Nossos dados sugerem que os polimorfismos -889 no gene *IL1A* e +3954 no gene *IL1B* não podem ser identificados como fatores de susceptibilidade à ocorrência do granuloma piogênico bucal em indivíduos brasileiros.

Palavras-chave: Interleucina-1 alfa. Interleucina-1 beta. Granuloma piogênico bucal. Polimorfismo genético.

1 INTRODUÇÃO

O granuloma piogênico (GP) é uma lesão relativamente comum na boca, caracterizada pela presença de tecido de granulação, com infiltrado inflamatório misto e marcante proliferação de células endoteliais (JAFARZADEH et al., 2006). A presença de intensa proliferação de células endoteliais estimulou a realização de diversos estudos sobre mecanismos angiogênicos presentes no GP. Yuan et al. (2000) detectaram expressão significativamente maior do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) e menor expressão do fator anti-angiogênico angiostatina no GP, quando comparado à gengiva sadia ou com periodontite, sugerindo que um desequilíbrio entre os fatores controladores da angiogênese possa estar envolvido na patogênese do GP. Bragado et al. (1999) detectaram elevada expressão imunistoquímica do VEGF em amostras de GP nas áreas de células endoteliais em proliferação, sem formação de lúmen vascular, sugerindo que a produção de VEGF possa ser predominante nas células endoteliais precursoras ou imaturas durante o desenvolvimento do GP. A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também está aumentada nas células endoteliais e nas células estromais do GP, sugerindo participação na angiogênese e crescimento do GP (SHIMIZU et al., 1998).

Interleucina-1 (IL-1) representa uma família de duas citocinas agonistas, IL-1 α e IL-1 β , e uma antagonista, IL-1Ra, que são pleiotrópicas e afetam as respostas inflamatórias, imunológicas, a hematopoiese, a angiogênese e a biologia óssea, além do crescimento e disseminação tumorais (revisado por APTE; VORONOV, 2002). Muitos tipos celulares, principalmente células fagocitárias, produzem e secretam IL-1 α e IL-1 β e IL-1Ra, em resposta a microorganismos e seus produtos, citocinas, e outros estímulos do microambiente (DINARELLO, 1996; APTE; VORONOV, 2002).

O efeito estimulatório da produção de VEGF pelas citocinas IL-1 α e IL-1 β em diferentes tecidos e condições patológicas tem sido demonstrado por vários autores (SALVEN et al., 2002; INOUE et al., 2005; HATAKEYAMA et al., 2007; BANDO et al., 2009; YANG et al., 2012). O VEGF é um dos mais potentes fatores angiogênicos e o principal regulador da proliferação endotelial, controlando ainda a permeabilidade vascular a migração de monócitos e osteoclastos (FERRARA et al., 1992; DVORAK

et al., 1995; NAKAGAWA et al., 2000).

Diversos estudos têm avaliado a existência de associação entre polimorfismos no gene *IL1* e o risco de desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças humanas, nas quais mecanismos inflamatórios e angiogênicos participam de sua patogênese (DUTRA et al, 2009). As citocinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra são codificadas pelos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN*, respectivamente, os quais estão localizados no cromossomo 2 e são polimórficos em vários loci (revisado por DUTRA et al., 2009). A variação C/T foi descrita no promotor de *IL1A* (-889), estando o alelo T associado a um aumento de quatro vezes na expressão de IL-1 α e o genótipo CC a menor atividade transcricional e menores níveis circulantes de IL-1 α , quando comparado ao TT (DOMINICI et al., 2002). O polimorfismo de nucleotídeo único C/T foi descrito no gene *IL1B* (+3954) e está associado com maior secreção de IL-1 β em indivíduos com genótipo TT (POCIOT et al., 1992).

O granuloma piogênico (GP) é uma lesão de etiologia ainda incerta, embora alguns autores acreditem que fatores irritativos locais como acúmulo de placa e cálculo, dentes mal posicionados e restaurações mal adaptadas possam causar a lesão (AL-KHATEEB; ABABNEH, 2003). Entretanto, a maioria da população apresenta esses fatores irritativos locais e somente uma pequena parcela desta, desenvolve o GP. Desse modo, fatores intrínsecos ao indivíduo devem determinar a predisposição ou não ao surgimento do GP frente à irritação local. Na literatura, não há estudos avaliando a presença de genes polimórficos e sua possível correlação com a patogenia do granuloma piogênico. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a existência de associações entre polimorfismos funcionais nos genes codificadores das citocinas IL-1 α e IL-1 β e a ocorrência de granuloma piogênico bucal em uma população brasileira.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Este estudo transversal envolveu indivíduos do Estado de Minas Gerais na região sudeste do Brasil. Pacientes atendidos nas clínicas do Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais e da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais foram incluídos neste

estudo. A amostra foi dividida em dois grupos: indivíduos com granuloma piogênico bucal (GP) e indivíduos sem evidência clínica ou história de granuloma piogênico ou outro processo proliferativo não neoplásico bucal, compondo o grupo controle (C). No grupo GP, as amostras foram estratificadas de acordo com a ocorrência da lesão (primárias ou recorrentes) e quanto a localização (gengiva ou outros sítios da mucosa bucal). Nenhuma paciente com GP encontrava-se grávida. Todos os pacientes com granuloma piogênico foram submetidos à excisão cirúrgica das lesões e as mesmas foram submetidas a exame anatomopatológico para confirmação do diagnóstico. Todas as lesões de granuloma piogênico exibiam histologicamente numerosas células endoteliais dispostas em cordões, lençóis ou formando espaços vasculares dentro da lâmina própria da mucosa, além de infiltrado inflamatório misto. Todos os pacientes eram provenientes da mesma área geográfica e apresentavam condição sócio-econômica semelhante. A Tabela 1 apresenta dados gerais dos indivíduos, bem como a estratificação dos pacientes com GP.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas (CAAE: 0118.0.213.000-05) e um termo de consentimento esclarecido foi obtido dos indivíduos participantes.

2.2 Obtenção das amostras e extração do DNA

Amostras de DNA foram obtidas a partir de raspados de mucosa bucal ou de tecidos incluídos em parafina. Células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas por meio de escova cervical estéril. Após raspagem da mucosa, as escovas foram imediatamente mergulhadas em 1,5mL de solução de Krebs (7.25 g/L NaCl, 0.30 g/L KCl, 2% CaCl₂, 2% H₂O, 0.29 g/L MgSO₄, 5.95 g/L KH₂PO₄, 1.80 g/L C₆H₁₂O₆). A extração de DNA foi realizada por meio de protocolo semelhante ao descrito por Boom et al., 1990, com algumas modificações. O raspado da mucosa foi submetido à centrifugação, a 200g por 5 minutos, para obtenção do “pellet” das células. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados 450 µl de solução de lise celular (6 M GuSCN, 65mM Tris-HCl pH 6.4, 25mM EDTA and 1.5% Triton X-100) e 20 µl de suspensão de sílica (SiO₂; Sigma, St Louis, MO, USA) em microtubos. As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas em banho seco a 56°C, por 30 minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a sílica

(contendo DNA adsorvido) foi lavada duas vezes com 450 µl de tampão de lavagem (6,0M GuSCN, 65mM Tris-HCl pH=6,4), três vezes com etanol 70% e, finalmente, uma vez com acetona. O sobrenadante foi descartado e o restante da acetona evaporado a 56°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 100µl de TRIS-EDTA (10mM Tris-HCl pH=8,0 and 1mM EDTA) e solução foi incubada a 56°C por 12 horas. Após agitação, a solução foi centrifugada e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo e armazenado a -20°C.

Para extração de DNA das amostras de granuloma piogênico incluídas em parafina, foi utilizado o método descrito por Isola et al., em 1994, com algumas modificações. Foram obtidos em torno de 10 cortes histológicos viáveis de 10µm de espessura obtidos no micrótomo e colocados em microtubos. Para remoção da parafina os cortes foram lavados três vezes por meio de adição de 1mL de xilol, seguida de agitação, incubação a 65°C por 10 minutos, centrifugação a 200g por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Em seguida, os cortes foram hidratados com etanol em sequencia decrescente de concentração (duas lavagens com etanol absoluto, uma com etanol a 90% e outra com etanol a 70%), por meio de adição de 1mL de etanol e centrifugação a 200g por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os microtubos foram deixados abertos por 10 minutos para evaporação do etanol. Foram adicionados 400µL de solução de proteinase K (500µg/mL) diluída em tampão (NaCl 0,5M, 0,05M TRIS pH=8,0, 0,125M EDTA pH=8,0, 2,5% SDS) e os tubos mantidos a 56°C por 3 a 5 dias, até completa digestão da amostra, quando o líquido apresentava-se translúcido. A cada dia de digestão foram adicionados mais 50µL de solução de proteinase K (1500µg/mL). Para inativação da proteinase K, os microtubos foram incubados a 95°C por 10 minutos. Para precipitação das proteínas foram adicionados 300µL de acetato de amônio 4M e, após agitação vigorosa, as amostras foram mantidas a -20°C por 10 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 300g por 5 minutos e o sobrenadante contendo DNA transferido para outro microtubo. Finalmente, foram adicionados 60µL de isopropanol e as amostras foram incubadas a -20°C por 18 horas. Após centrifugação a 300g por 20 minutos e descarte do sobrenadante, foi obtido "pellet" de DNA.

2.3 Reação em cadeia da polymerase (PCR) e digestão com endonuclease de restrição

Os polimorfismos de *IL1B* (+3954) e *IL1A* (-889) foram analisados por meio do método de reação em cadeia da polimerase para detecção de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP). Para polimorfismo de *IL1B* foram utilizadas as sequências de iniciadores para PCR 5'-CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAA-3' e 5'-GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG-3' com produtos de PCR de tamanhos esperados de 194 pares de bases (Kornman et al., 1997). Para polimorfismo de *IL1A* foram usados iniciadores 5'-AAGCTTGTTCTACCACCTGAACTAGGC-3' e 5'-TTACATATGAGCCTTCCATG-3' com produtos de PCR esperados de 99pb (Kornman et al., 1998). PCR foi realizado em volume total de 25µl, contendo 200ng de DNA, 12.5µl de tampão Pré-mix (Phoneutria Biotecnologia-Brazil), além dos iniciadores (20 pMol/reação). As condições de amplificação consistiram de 94°C por 3 minutos, seguida de ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 35 segundos e 72°C por 30 segundos, além de 72°C por 5 minutos de alongamento final para cada par de iniciador utilizado. As reações foram realizadas com 35 ciclos para *IL1B* e 45 ciclos para *IL1A*. Para detecção de polimorfismo de *IL1B*, os produtos de PCR foram digeridos com 5 unidades da enzima *TaqI* (MBI Fermentas), a 65°C por 4 horas, e foram obtidos produtos de digestão de 97+85+12 pb e 182+12 pb para os alelos C e T, respectivamente. Para detecção de polimorfismo de *IL1A* foram utilizadas 5 unidades da enzima *NCoi* (MBI Fermentas), a 37°C por 4 horas, e foram obtidos produtos de digestão de 99 pb e 83+16 pb para os alelos T e C, respectivamente. A visualização das bandas foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, corado com prata.

2.4 Análises estatísticas

Análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando-se o software JMP (SAS, Cary, NC, USA). O teste Chi-quadrado foi utilizado para comparar as distribuições dos genótipos entre os grupos, por meio de tabelas de contingência 3x2 e 2x2. Para análise das distribuições dos alelos entre os grupos foram elaboradas tabelas de contingência 2x2. O teste exato de Fisher foi aplicado quando necessário. O nível de significância considerado foi de 5%.

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo.

Características	Controle (C)	Granuloma piogênico (PG)
Número de indivíduos (n)	89	84
Mediana de idade (anos)	26	33
Gênero		
masculino (%)	15.3	30.7
feminino (%)	84.7	69.3
Ocorrência da lesão		
primária (%)	-	85.2
recorrente (%)	-	14.8
Localização da lesão		
gingiva (%)	-	58.1
outra (%)	-	41.9

3 RESULTADOS

As distribuições dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos de *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954) são apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos e dos alelos para ambos os polimorfismos entre os grupos controle e granuloma piogênico. (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos e alelos de *IL1A* (-889) nos grupos avaliados.

<i>IL1A</i> (-889)	Controle (C)	Granuloma piogênico (GP)
Genótipo		
CC (%)	31 (36,9)	17 (24,2)
CT (%)	48 (57,1)	48 (68,6)
TT (%)	5 (6)	5 (7,2)
Alelo		
C (%)	110 (65,5)	82 (58,6)
T (%)	58 (34,5)	58 (41,4)

* Teste Qui-quadrado: $p=0,24$ (genótipos) e $p=0,21$ (alelos)

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos e alelos de *IL1B* (+3954) nos grupos avaliados.

<i>IL1B</i> (+3954)	Controle (C)	Granuloma piogênico (PG)
Genótipo		
CC (%)	52 (58,4)	45 (62,5)
CT (%)	36 (40,5)	26 (36,1)
TT (%)	1 (1,1)	1 (1,4)
Alelos		
C (%)	140 (78,7)	116 (80,5)
T (%)	38 (21,3)	28 (19,5)

* Teste Qui-quadrado: $p=0,84$ (genótipos) e Fisher $p=0,67$ (alelos)

Foi realizada também avaliação da distribuição dos genótipos nos pacientes com granuloma piogênico, comparando localização, entre gengival ou extra-gengival (outra), e manifestação, entre primitiva ou recorrente (Tabela 4). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi detectada.

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos e alelos de *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954) no grupo granuloma piogênico de acordo com a localização e manifestação da lesão.

	Localização		Manifestação	
	Gengiva	Outra	Primitiva	Recorrente
<i>IL1A</i> (-889)				
CC (%)	11 (26,2)	10 (35,7)	18 (31)	3 (25)
CT (%)	27 (64,3)	17 (60,7)	36 (62,1)	8 (66,7)
TT (%)	4 (9,5)	1 (3,8)	4 (6,9)	1 (8,3)
<i>IL1B</i> (+3954)				
CC (%)	32 (71,1)	13 (48,1)	36 (61)	9 (69,2)
CT (%)	12 (26,7)	14 (51,9)	22 (37,3)	4 (30,8)
TT (%)	1 (2,2)	0	1 (1,7)	0

* Teste Qui-quadrado: $p=0,50$ (localização *IL1A*) e $p=0,082$ (localização *IL1B*)
 $p=0,91$ (manifestação *IL1A*) e $p=0,79$ (manifestação *IL1B*)

4 DISCUSSÃO

O granuloma piogênico é uma lesão proliferativa não neoplásica que acomete principalmente a gengiva e geralmente apresenta ulceração superficial e sangramento ao toque. Embora alguns autores tenham considerado o GP como uma neoplasia benigna (MILLS et al., 1980), atualmente é consenso que a lesão apresenta natureza reativa em resposta á vários estímulos como irritação crônica local de baixa intensidade (JAFARZADEH et al., 2006), trauma mecânico ou fatores hormonais (BHASKAR; JACOWAY, 1966; MUSSALLI et al., 1976). Como a história de trauma local precedendo o surgimento de GP é pouco frequente, outros fatores devem ser mais prevalentes na indução do desenvolvimento do GP (MACLEODI; SOAMES, 1987; EPIVATIANOS et al., 2005). Higienização bucal deficiente pode ser um importante fator indutor em muitos pacientes (JAFARZADEH, 2006).

O GP bucal mostra grande predileção pela gengiva, compreendendo cerca de 75% dos casos, onde os fatores etiológicos mais prováveis são o acúmulo de placa e cálculo ou a presença de corpos estranhos no sulco gengival (EPIVATIANOS et al., 2005). A porção marginal da gengiva é a mais acometida e em apenas cerca de 15% dos casos a lesão se desenvolve na porção alveolar do periodonto de proteção (VILMANN et al., 1986). Recorrências após excisão cirúrgica podem ser devidas à manutenção de fatores irritativos locais, como acúmulo de placa e cálculo e fontes de trauma (JAFARZADEH et al., 2006). Em mulheres grávidas, onde o desequilíbrio nos hormônios sexuais aumenta a predisposição ao GP, o rígido controle de placa bacteriana é a principal forma de prevenção e controle da lesão (STEELMAN; HOLMES, 1992).

Os fatores etiológicos propostos para o surgimento do GP apontam para a participação de fatores irritativos locais, atuando principalmente nos tecidos periodontais de proteção, em um indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de um processo inflamatório caracterizado pela formação de tecido de granulação e intensa angiogênese. Como a frequência de GP bucal é bastante inferior a ocorrência de fatores irritativos locais nos tecidos bucais na população em geral, é possível que fatores intrínsecos ao indivíduo determinem a predisposição ao desenvolvimento de GP, especialmente aqueles não associados à gravidez.

Polimorfismos gênicos podem alterar a expressão e a função de genes, causando efeitos no fenótipo do indivíduo e conferindo assim, susceptibilidade a

doenças (HART, 2002). Especificamente, diferentes variações alélicas podem alterar a estrutura dos tecidos, os mecanismos efetores das respostas imunes celular e humoral e os níveis de mediadores inflamatórios produzidos (RANDOLPH et al., 2004; KINANE et al., 2005). Diversos estudos têm mostrado associações entre polimorfismos nos genes *IL1* e doença periodontal (KORNMAN e Di GIOVINE, 1998; GALBRAITH et al., 1999; PAPAPANOU et al., 2001). Moreira et al. (2005) mostraram associação entre o polimorfismo do gene *IL1B*, locus +3954 (C/T) e doença periodontal crônica em uma população brasileira. Em outro estudo, polimorfismo -889 (C/T) no gene *IL1A* foi associado à doença periodontal crônica, independentemente da agressividade da doença ou do hábito de fumar dos pacientes (MOREIRA et al., 2007). Estes estudos sugerem que polimorfismos nos genes de IL-1 α e IL-1 β constituem fatores de risco para periodontite crônica em indivíduos brasileiros.

Interleucina-1 é uma citocina pró-inflamatória que desempenha importante papel nas doenças crônicas. Essa citocina participa da estimulação dos mecanismos celulares que levarão à instalação do processo inflamatório, como a produção de quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, eventos cruciais para o recrutamento de leucócitos do sangue (APTE; VORONOV, 2002). Além disso, IL-1 é um potente indutor, em vários tipos celulares, da síntese e secreção de fatores angiogênicos, como o VEGF, importantes no desenvolvimento de lesões com exuberante componente vascular (SALVEN et al., 2002; INOUE et al., 2005; BANDO et al., 2009). Bando et al (2009) mostraram que estimulação *in vitro* de células do ligamento periodontal de humanos com IL-1 α induz a produção de VEGF. Além disso, IL-1 β estimula a proliferação, migração e adesão de células progenitoras endoteliais e aumenta a expressão de VEGF-A nessas células (YANG et al., 2012). No granuloma piogênico, diversos estudos têm mostrado a expressão de VEGF, principalmente nas células endoteliais em proliferação, sem formação de lúmen vascular, sugerindo estimulação da angiogênese pelas próprias células endoteliais precursoras ou imaturas durante o desenvolvimento das lesões (BRAGADO et al., 1990; YUAN et al., 2000).

Polimorfismos de nucleotídeo único no gene da citocina IL-1 causam alterações funcionais. Uma única troca de base C por T na região promotora (-889) do gene *IL1A* está associada a um aumento na expressão de IL-1 α (SHIRODARIA et

al., 2000). Polimorfismo no *locus* +3954 (C/T) do gene *IL1B* também tem sido associado com o aumento da produção desta citocina. Indivíduos homocigotos para o alelo T produzem quatro vezes mais IL-1 β em comparação a indivíduos com o genótipo CC (POCIOT et al., 1992). Nos últimos anos, tem sido sugerido que esse polimorfismo pode explicar porque alguns indivíduos apresentam resposta mais intensa que outros frente a um mesmo estímulo (LANG et al., 2000).

Neste estudo nós avaliamos polimorfismos nos *loci* -889(C/T) do gene *IL1A* e +3954 (C/T) do gene *IL1B* em uma amostra da população brasileira acometida ou não pelo granuloma piogênico bucal. Nossos resultados mostraram não haver associação entre o alelo T, em ambos os genes estudados, o qual determina maior produção de ambas as citocinas, e a ocorrência de granuloma piogênico bucal. A distinção entre localização gengival ou extra-gengival foi considerada neste estudo, pois os fatores irritativos locais que atuam nessas regiões são de natureza e intensidade diferentes. A ocorrência de recidivas pode significar maior predisposição individual ao granuloma piogênico. Dessa forma, estratificamos os casos de granuloma piogênico quanto à localização, recorrência ou sexo e analisamos as frequências dos polimorfismos. Entretanto, os resultados também não mostraram associação com os genótipos que codificam alta produção das citocinas em ambos os genes. Na literatura não há estudos avaliando polimorfismos no granuloma piogênico, nem em outros processos proliferativos não neoplásicos da boca, o que impede a comparação e limita a interpretação dos prováveis fatores intrínsecos envolvidos na susceptibilidade individual ao desenvolvimento dessas lesões.

Polimorfismos em genes de citocinas também têm sido investigados em diferentes doenças bucais, algumas delas de natureza essencialmente inflamatória e outras onde a resposta inflamatória apresenta papel secundário. Independente da natureza da lesão, polimorfismos de genes de citocinas foram associados com a ocorrência de algumas doenças bucais: associação de polimorfismos de *IL6*, e *TNFA* no líquen plano bucal (XAVIER et al., 2007; CARROZZO et al., 2004; BAI et al., 2007); polimorfismos de *IL1B* e *IL6* na ulceração aftosa recorrente (GUIMARÃES et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2007); e de *IL1B*, *IL6* e *TNFA* com desenvolvimento de abscesso odontogênico sintomático (SÁ et al., 2007). Isso sugere que essas moléculas podem desempenhar papel importante na patogênese dessas doenças ou que polimorfismos em seus genes podem ter efeito indireto, afetando a expressão de outros genes ou estando em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos

genéticos que afetam diretamente as doenças.

Concluindo, este estudo mostrou que os polimorfismos nos loci -889 (C/T) do gene *IL1A* e +3954 (C/T) do gene *IL1B* não podem ser identificados como fatores de susceptibilidade à ocorrência do granuloma piogênico bucal em indivíduos brasileiros. O estudo de polimorfismos de outros genes, principalmente aqueles relacionados ao controle dos processos inflamatórios e da angiogênese, pode contribuir para a melhor compreensão da etiopatogênese do granuloma piogênico bucal. Nós acreditamos que a identificação de marcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento de processos proliferativos inflamatórios reacionais nos tecidos periodontais, como o granuloma piogênico, poderão permitir a identificação de indivíduos com alto risco às lesões e possivelmente ajudar no estabelecimento de terapias mais individualizadas.

Abstract

Interleukin-1 is an important inflammatory cytokine that stimulates leukocyte recruitment to inflammatory sites and production of potent angiogenic factors, as VEGF, that are involved in pyogenic granuloma (PG) development. Functional polymorphisms in cytokine genes can predispose individuals to disease by enhancing inflammatory process. The aim of this study was investigate associations between *IL1A* and *IL1B* gene polymorphisms and oral GP occurrence. Genomic DNA was obtained from oral swabs or paraffin-embedded tissues of 84 individuals with GP and 89 without GP (control group) and amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers flanking the *locus* -889 of *IL1A* and +3954 of *IL1B*. PCR products were submitted to restriction endonucleases digestion and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, to distinguish alleles C or T, allowing for determination of the genotypes and detection of the polymorphisms. The distributions of genotypes and frequencies of T allele for *IL1A* and *IL1B* genes were not significantly different between GP and control groups. Moreover, there was no association between genotypes and GP location or recurrence. Our data suggest that the polymorphism in the *IL1A* gene at position -889 and *IL1B* gene at position +3954 could not be identified as susceptibility factors for oral pyogenic granuloma in a sample of Brazilian individuals.

Key words: Interleukin-1 alpha. Interleukin-1 beta. Oral pyogenic granuloma. Gene polymorphism.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado por recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIP) e pelo Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PROBIC) da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

AL-KHATEEB, T.; ABABNEH, K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 11, p. 1285-1288, Nov. 2003.

APTE, R. N.; VORONOV, E. Interleukin-1: a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. **Seminars in Cancer Biology**, v.12, n. 4, p. 277-290, Aug. 2002.

BANDO, Y. et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 is involved in vascular endothelial growth factor production in interleukin-1alpha-stimulated human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 3, p. 395-401, Jun. 2009.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.

BRAGADO, R. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in pyogenic granulomas. **Acta Dermato-Venereology**, v. 79, n. 6, p. 422-425, Nov. 1999.

CARROZZO, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 1, p. 87-84, Jan. 2004.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, 2095-2147, Mar. 1996.

DOMINICI, R. et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. **Immunogenetics**, v. 54, n. 2, p. 82-86, May 2002.

DUTRA, W. O. et al. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 2, p. 223-232, Jun. 2009.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 5, May, p. 1029-1039, 1995.

EPIVATIANOS, A. et al. Pyogenic granuloma of the oral cavity: comparative study of its clinicopathological and immunohistochemical features. **Pathology International**, v. 55, n. 7, p. 391-397, Jul. 2005.

FERRARA, N. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Review**, v.13, n. 1, p. 18-32, Feb. 1992.

GUIMARÃES, A. L. et al. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha in individuals with recurrent aphthous stomatitis. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 3, p. 268-272, Mar. 2007.

GUIMARÃES, A. L. et al. Association of interleukin-1beta polymorphism with recurrent aphthous stomatitis in Brazilian individuals. **Oral Diseases**, v. 12, n. 6, p. 580-583, 2006.

HART, S. P. 1L12B promoter polymorphism and asthma. **Lancet**, v. 360, n. 9350, p. 2085, Dec. 2002.

HATAKEYAMA, M. Interleukin-1 induces the expression of vascular endothelial growth factor in human pericardial mesothelial cells. **Heart and Vessels**, v. 22, n. 2, p. 123-127, Mar. 2007.

INOUE K. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. **Rheumatology International**, v. 26, n. 2, p. 93-98, Dec. 2005.

ISOLA J. et al. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **The American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.

JAFARZADEH, H.; SANATKHANI, M.; MOHTASHAM, N. Oral pyogenic granuloma: a review. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 167-175, 2006.

KINANE, D. F.; SHIBA, H.; HART, T. C. The genetic basis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v.39, p.91-117, 2005.

KORNMAN, K. S. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 1, p. 72-77, Jan. 1997.

KORNMAN KS, D. I.; GIOVINE, F. S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 327-338, Jul. 1998.

LANG, N. P. et al. Effect of interleukin-1 polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. **Journal of Periodontal Research**, v. 35, n. 2, p. 102-107, Apr. 2000.

MILLS, S. E.; COOPER, P. H.; FECHNAR, R. E. Lobular capillary hemangioma: the underlying lesion of pyogenic granuloma. A study of 73 cases from the oral and nasal mucous membranes. **The American Journal Surgical Pathology**, v. 4, n. 5, p. 470-479, Oct. 1980.

MOREIRA, P. R. et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 4, p. 306-311, Aug. 2005.

MOREIRA, P. R. et al. The *IL1A* (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, n. 1, p. 23-30, Feb. 2007.

MUSSALLI, N. G.; HOPPS, R. M.; JOHNSON, N. W. Oral pyogenic granuloma as a complication of pregnancy and the use of hormonal contraceptives. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v.14, n. 2, p. 187-191, 1976.;

MACLEOD, R. I.; SOAMES, J. V. Epulides: a clinicopathological study of a series of 200 consecutive lesions. **British Dental Journal**, v. 163, n. 2, p. 51-53, Jul. 1987.

NAKAGAWA, K. et al. Angiogenesis and its regulation. Roles of vascular endothelial cell growth factor. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 26, n. 1, p. 61-66, 2000.

POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 6, p. 396-402, Jun. 1992.

RANDOLPH, A. G. et al. The IL12B gene is associated with asthma. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 4, p. 709-715, Oct. 2004.

SÁ, A. R. et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 7, p. 563-572, Jul. 2007.

SALVEN, P. et al. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. **FASEB Journal**, v. 16, n. 11, p. 1471-1473, Sept. 2002.

SHIMIZU, K. et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed in granuloma pyogenicum. **The British Journal of Dermatology**, v.138, n. 5, p. 769-773, May 1998.

SHIRODARIA, S. et al. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin 1 alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 11, p. 1864-1869, Nov. 2000.

STEELMAN, R.; HOLMES, D. Pregnancy tumor in a 16-year-old: case report and treatment considerations. **The Journal of Clinic Pediatric Dentistry**, v.16, n. 3, p. 217-218, Spring 1992.

VILMANN, A.; VILMANN, P.; VILMANN, H. Pyogenic granuloma: evaluation of oral conditions. **The British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 24, n.5, p. 376-382, Oct. 1986.

XAVIER, G. M. et al. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 476-481, Sept. 2007.

YANG, L. et al. Interleukin-1 beta increases activity of human endothelial progenitor cells: involvement of PI3K-Akt signaling pathway. **Inflammation**, 29 Feb. 2012.

YUAN, K.; JIN, Y. T. LIN, M. T. The detection and comparison of angiogenesis-associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 5, p. 701-709, May 2000.

REFERÊNCIAS

AL-KHATEEB, T.; ABABNEH, K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 61, n. 11, p. 1285-1288, Nov. 2003.

ANGELOPOULOS, A.P. Pyogenic granuloma of the oral cavity: statistical analysis of its clinical features. **Journal of Oral Surgery**, v.29, n.12, p.840-847, Dec.1971.

APTE, R. N.; VORONOV, E. Interleukin-1: a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. **Seminars in Cancer Biology**, v.12, n. 4, p. 277-290, Aug. 2002.

BANDO, Y. et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 is involved in vascular endothelial growth factor production in interleukin-1alpha-stimulated human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 3, p. 395-401, Jun. 2009.

BHASKAR, S. N.; JACOWAY, J. R. Pyogenic granuloma: clinical features, incidence, histology, and result of treatment: report of 242 cases. **Journal of Oral Surgery**, v.24, n.5, p.391-398, Sept. 1966.

BRAGADO, R. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in pyogenic granulomas. **Acta Dermato-Venereology**, v. 79, n. 6, p. 422-425, Nov. 1999.

BRASILEIRO FILHO, Bogliolo. **Patologia geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BRENCHLEY, P. E. Angiogenesis in inflammatory joint disease: a target for therapeutic intervention. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 121, n.3, p. 426-429, Sept. 2000.

CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor. A unique regulator of blood vessel function. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.47, n. 3, p.219-223, Nov. 1991.

DALEY, T. D.; NARTEY, N. O.; WYSOCKI, G. P. Pregnancy tumor: an analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, v.72, n.2, p.196-199, Aug. 1991.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, 2095–2147, Mar. 1996.

DOMINICI, R. et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. **Immunogenetics**, v. 54, n. 2, p. 82-86, May 2002.

DUTRA, W. O. et al. Implications of cytokine gene polymorphisms on the orchestration of the immune response: lessons learned from oral diseases. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 2, p. 223-232, Jun. 2009.

DVORAK, H. F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 5, May, p. 1029-1039, 1995.

EPIVATIANOS, A. et al. Pyogenic granuloma of the oral cavity: comparative study of its clinicopathological and immunohistochemical features. **Pathology International**, v. 55, n. 7, p. 391-397, Jul. 2005.

FERRARA, N. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Review**, v.13, n. 1, p. 18-32, Feb. 1992.

HART, S. P. 1L12B promoter polymorphism and asthma. **Lancet**, v. 360, n. 9350, p. 2085, Dec. 2002.

HATAKEYAMA, M. Interleukin-1 induces the expression of vascular endothelial growth factor in human pericardial mesothelial cells. **Heart and Vessels**, v. 22, n. 2, p. 123-127, Mar. 2007.

HENRY, F. et al. Blood vessel changes during pregnancy: a review. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.7, n. 1, p.65-69, 2006.

IMAIZUMI, T. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1alpha--an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 6, p. 949-955, Jun. 2000.

INOUE K. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. **Rheumatology International**, v. 26, n. 2, p. 93-98, Dec. 2005.

JAFARZADEH, H.; SANATKHANI, M.; MOHTASHAM, N. Oral pyogenic granuloma: a review. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 167-175, 2006.

KANDA, N.; WATANABE, S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, n. 1, p. 1-7, Apr 2005.

KFIR, Y.; BUCHNER, A.; HANSEN, L. S.; Reactive lesions of the gingiva: a clinicopathological study of 741 cases. **Journal of Periodontology**, v. 51, n.11, p. 655-661, Nov. 1980.

KINANE, D. F.; SHIBA, H.; HART, T. C. The genetic basis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v.39, p.91-117, 2005.

KORNMAN, K. S. et al. Interleukin-1 genotypes and the association between periodontitis and cardiovascular disease. **Journal of Periodontal Research**, v.34, n. 7, p.353-357, Oct. 1999.

LEE, A. et al. Bacterial and salivary biomarkers predict the gingival inflammatory profile. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 1, p. 79-89, Jan. 2012.

MILLER, M. C. et al. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters**, v.120, n. 1-3, p.269-280, Mar. 2001.

NAKAGAWA, K. et al. Angiogenesis and its regulation. Roles of vascular endothelial cell growth factor. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 26, n. 1, p. 61-66, 2000.

NEVILLE, B.W. et al. Tumores dos tecidos moles In: NEVILLE, B.W. et al. **Patologia oral e maxillofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap.12, p.353-404.

OTTO PG, et al. **Genética humana e clínica**. São Paulo: Rocca, 1998. 333p.

POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22, n. 6, p. 396-402, Jun. 1992.

SAKUTA, T. et al. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 3, p.233-237, Mar. 2001.

SALVEN, P. et al. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. **FASEB Journal**, v. 16, n. 11, p. 1471-1473, Sept. 2002.

SCHMID, M. C. et al. Combined blockade of integrin- α 4 β 1 plus cytokines SDF-1 α or IL-1 β potently inhibits tumor inflammation and growth. **Cancer Research**, v. 71, n. 22, p. 6965-6975, Nov. 2011.

SHIMIZU, K. et al. Inducible nitric oxide synthase is expressed in granuloma pyogenicum. **The British Journal of Dermatology**, v.138, n. 5, p. 769-773, May 1998.

SILLS, E. S. et al. Clinical diagnosis and management of hormonally responsive oral pregnancy tumor (pyogenic granuloma). **The Journal of Reproductive Medicine**, v.41, n.7, p. 467-470, 1996.

SOORIYAMOORTHY, M.; GOWER, D. B. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 16, n.4, p. 201-208, Apr. 1989.

STYLIANOU, E.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n.10, p. 1075-1079, Oct. 1998.

THOMPSON, M. W. et al. **Genética médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

TUMINI, V. et al. Hyperplastic gingival lesions in pregnancy. I. Epidemiology, pathology and clinical aspects. **Minerva Stomatologica**, v.47, n. 4, p. 159-167, 1998.

WORMHOUDT, L. W.; COMMANDEUR, J. N.; VERMEULEN, N. P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 1, p.59-124, Jan. 1999.

YANG, L. et al. Interleukin-1 beta increases activity of human endothelial progenitor cells: involvement of PI3K-Akt signaling pathway. **Inflammation**, 29 Feb. 2012.

YUAN, K.; JIN, Y. T. LIN, M. T. The detection and comparison of angiogenesis-associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 5, p. 701-709, May 2000.

YUAN, K.; WING, L. Y.; LIN, M. T. Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 7, p. 701-708, July 2002.