



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
INTEGRADA**

THAÍS MUNHOZ PEREIRA

**A CASE-CONTROL STUDY SUGGESTS *TNFAIP3* AS
A NEW GENETIC RISK FACTOR FOR BENIGN
MIGRATORY GLOSSITIS**

Curitiba

2020

THAÍS MUNHOZ PEREIRA

**A CASE-CONTROL STUDY SUGGESTS *TNFAIP3* AS
A NEW GENETIC RISK FACTOR FOR BENIGN
MIGRATORY GLOSSITIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada (Ênfase em Ortodontia).

Orientadora: Prof. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira

Curitiba

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

P436c
2020
Pereira, Thaís Munhoz
A case-control study suggests TNFAIP3 as a new genetic risk factor for benign migratory glossitis / Thaís Munhoz Pereira ; orientadora: Paula Cristina Trevilatto ; coorientador: Marcelo Távora. – 2020.
74 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020

Inclui bibliografia

1. Odontologia. 2. Boca - Doenças. 3. Epidemiologia molecular. 4. Glossite migratória benigna. 5. Inflamação. 6. Mucosa bucal. 7. Proteína 3 induzida por fator de necrose tumoral alfa. I. Trevilatto, Paula Cristina. II. Távora, Marcelo. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.6




Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO


THAÍS MUNHOZ PEREIRA

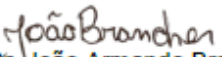
**A CASE-CONTROL STUDY SUGGESTS *TNFAIP3* AS A NEW GENETIC RISK FACTOR
FOR BENIGN MIGRATORY GLOSSITIS**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada com Ênfase em Ortodontia.


Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Orlando M. Tanaka
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Marcelo Távora Mira
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, PUCPR


Prof. Dr. João Armando Brancher
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UP


Prof^ª Dr^ª Rafaela Scariot de Moraes
Curso de Odontologia, UFPR

Curitiba, 11 de setembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde, pela minha família, amigos, pela força interior e por ter me dado condições de realizar este sonho.

Meu agradecimento especial aos meus pais Homero da Silva Pereira e Josiane Conceição Munhoz dos Santos pelo amor e carinho a mim concedidos, pelo ensinamento de valores, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela abdicção de seus sonhos para que os meus se tornassem realidade.

Agradeço ao meu irmão Rafael Munhoz Pereira, ao meu padrasto Jucelito de Souza e às minhas avós Maria Lúcia Bóccoli Pereira e Arlete Munhoz dos Santos pelos cuidados e apoio a mim oferecidos.

Agradeço ao meu namorado Peterson Ronny de Souza, pelo amor, incentivo, paciência e apoio.

Agradeço à minha orientadora Dra. Paula Cristina Trevilatto, que me concedeu oportunidades incríveis, dedicou seu precioso tempo a me orientar, sempre preocupada com a minha formação acadêmica, me incentivando e acreditando no meu potencial. Agradeço pela amizade, paciência e carinho.

Agradeço à Dra. Rafaela Scariot de Moraes, por ter me concedido suas amostras e seu tempo para me ajudar, ao Dr. Sérgio Aparecido Ignácio que em muito contribuiu para o meu aprendizado em estatística e ao meu coorientador Dr. Marcelo Távora Mira. Todos vocês engrandeceram a produção deste trabalho e a minha formação.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e em Ciências da Saúde pela contribuição para a minha formação, com um carinho especial dedicado aos professores da Ortodontia da PUCPR, Dr. Orlando Motohiro Tanaka, Dr. Odilon Guariza Filho e Dra. Elisa Souza Camargo que me acolheram nesta especialidade que tanto almejei me aperfeiçoar. Com vocês aprendi a buscar a perfeição para me conformar com a excelência!

Agradeço a todos os meus colegas de mestrado e doutorado, em especial à Laís Cristina Giacobbo e à Laysa Toschi Martins pela preciosa ajuda que me concederam, contribuindo também para o meu aprendizado.

Agradeço à secretaria do PPGO, Neide Reis Borges, por todo auxílio ofertado, sempre solícita e prontamente disposta a ajudar.

Agradeço aos pacientes participantes da pesquisa e a todos os outros que de alguma forma confiaram à PUCPR e a mim sua saúde para que minha formação fosse possível.

Agradeço à PUCPR pelo apoio financeiro concedido para que esse trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO.....	15
MÉTODO.....	16
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
ANEXOS	40
ARTIGO EM INGLÊS	40
Title page.....	40
Abstract	42
Introduction	43
Material and Methods	44
Results	47
Discussion.....	48
Conclusion.....	50
Tables	56
Figure.....	62
Parecer de comitê de ética.....	63
Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE	65
Normas para publicação - Clinical Oral Investigations.....	67
Produção científica.....	68
Trajória acadêmica e atividades complementares	74

INTRODUÇÃO

A glossite migratória benigna (GMB), conhecida também como língua geográfica, caracteriza-se como uma condição inflamatória crônica inespecífica. Clinicamente, apresenta-se na forma de erosões (áreas atróficas) circundadas por halo esbranquiçado (Figura 1) (Mangold, Torgerson, & Rogers, 2016). As lesões variam amplamente em tamanho, localização, número e forma. Comumente alternam de posição e estão associadas à perda das papilas filiformes do dorso lingual (Mangold et al., 2016; Pass, Brown, & Childers, 2005).



Figura 1. Manifestação de glossite migratória benigna – fase ativa. Caracterizada por áreas de erosão eritematosas, atróficas, e múltiplas, com bordas brancas e elevadas em relação ao centro da lesão. Fonte: Mangold et al., 2016.

Com relação à sintomatologia e evolução da GMB, as lesões geralmente oscilam entre períodos de remissão e reaparecimento. Quando há relato de desconforto, frequentemente este está associado à dor ou ardência (Mangold et al., 2016). Embora a condição não gere grandes prejuízos aos afetados, vale salientar que lesões na mucosa bucal podem ser importantes indicadores de saúde bucal e qualidade de vida (Villanueva-Vilchis, López-Ríos, García, & Gaitán-Cepeda, 2016). Além disso, a GMB pode refletir a existência de alterações sistêmicas (Tortorici, Corrao, Natoli, & Difalco, 2016), como é o caso da psoríase (Picciani et al., 2016).

A prevalência da língua geográfica é variável de acordo com a população estudada. Por não se tratar de agravo de notificação compulsória, dados em órgãos oficiais são menos comuns. Estudos transversais têm detectado diferentes

taxas epidemiológicas: em norte-americanos, foi estimada uma prevalência de 1,8% (Shulman & Carpenter, 2006); para a população turca, 1,5% (Miloğlu, Göregen, Akgül, & Acemoğlu, 2009); em malaios, 2,2% (Koay, Lim, & Siar, 2011), 7,86% em iranianos (Rezaei, Safarzadeh, Mozafari, & Tavakoli, 2015) e 1% em italianos (Tortorici et al., 2016). No Brasil, um trabalho detectou uma prevalência de GMB de 7% em população recrutada no Sudeste do país (Jorge, Gonzaga, Tomimori, Picciani, & Barbosa, 2017).

Scariot e colaboradores, em 2017, caracterizaram os aspectos citológicos da glossite migratória benigna (Scariot et al., 2017). Neste estudo, os autores descreveram histologicamente a língua geográfica como uma condição inflamatória, apresentando: diminuição do tamanho do citoplasma, com alteração da relação núcleo/citoplasma, aumento das células escamosas parabasais, diminuição da metacromasia celular, presença de halo perinuclear e espessamento das bordas do núcleo celular (Scariot et al., 2017).

Interessante ressaltar que a GMB pode apresentar características histopatológicas bastante similares às lesões da psoríase (Figura 2), sendo que alguns autores, inclusive, acreditam que a língua geográfica seja uma forma de psoríase oral (Picciani et al., 2016). Entretanto, este fato ainda é controverso entre a comunidade científica. Portanto, não é possível afirmar que a GMB seja um sinal patognomônico da psoríase, uma vez que nem todos os indivíduos com língua geográfica possuem essa doença dermatológica autoimune. Contudo, percebe-se uma alta prevalência de língua geográfica em portadores de psoríase (Picciani et al., 2012).

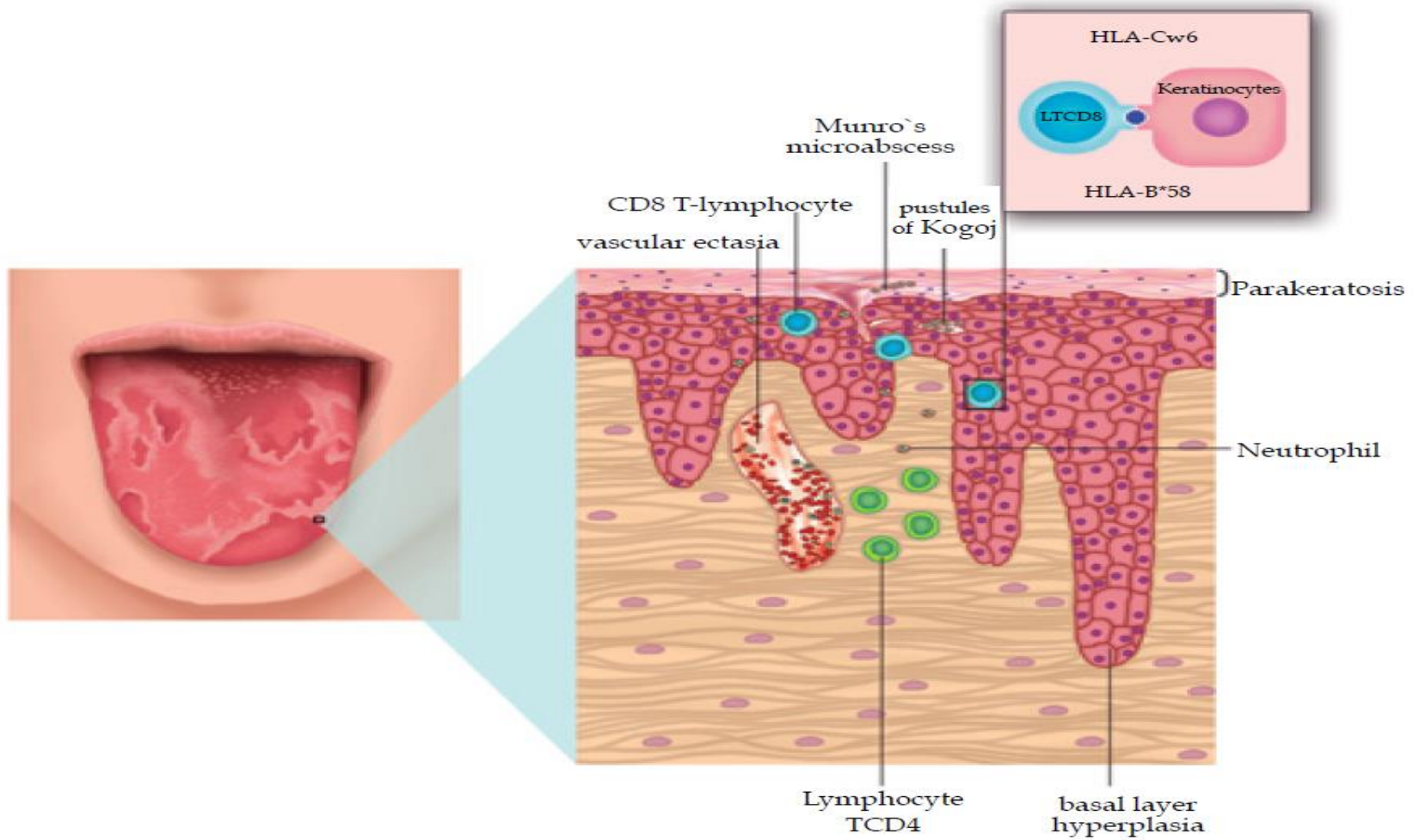


Figura 2. Características histopatológicas comuns à GMB e às lesões de Psoríase. Fonte: Picciani et al., 2016.

No que se refere à etiologia da língua geográfica, esta permanece incerta, uma vez que ainda não foi completamente elucidada. Entretanto, vários fatores associados com a sua manifestação têm sido sugeridos, tais como: estresse e ansiedade, fumo, distúrbios hormonais, coexistência de língua fissurada, diabetes mellitus, tendência à alergia, psoríase, entre outros (Huamei, Yu, Xin, Ga, & Qianming, 2015). Além disso, sugere-se a participação de modulação imunológica e genética na patogênese desta condição (Huamei et al., 2015; Jorge et al., 2017; Miloğlu et al., 2009; Picciani et al., 2016; Scariot et al., 2017), sendo inferido, inclusive, um caráter autoimune para a GMB.

Corroborando essa hipótese, análises imuno-histoquímicas revelam que lesões típicas apresentam um perfil celular com predomínio de linfócitos T CD4+ e macrófagos, além de anticorpos CD3, CD4, CD8, CD11c, CD22 e HLA-DR (Espelid, Bang, Johannessen, Leira, & Christensen, 1991). Nesse contexto, a resposta imunoinflamatória do paciente parece ser crucial para a manifestação da condição. Contudo, os mecanismos moleculares que desencadeiam a inflamação da mucosa lingual na GMB ainda não são perfeitamente compreendidos.

Por esse motivo, fatores imunogenéticos têm despertado a atenção da comunidade científica (Guimarães et al., 2007; Liang et al., 2017; Scariot et al., 2017), uma vez que estão envolvidos com mecanismos moleculares de considerável contribuição para a manifestação do fenótipo, juntamente com outros fatores de risco.

O relato na literatura de que o componente genético é um importante modulador da suscetibilidade do hospedeiro à GMB data da década de 1970 (Redman, Shapiro, & Gorlin, 1972). Nesse contexto, uma forma bastante interessante de evidenciar a participação da genética na manifestação de um traço complexo, é através da comparação das taxas de concordância fenotípica entre gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Ao encontrar uma maior taxa de ocorrência do fenótipo nos primeiros em comparação com os segundos, há forte argumento em favor da existência de componente genético controlando a suscetibilidade à condição/doença (Martin, Boomsma, & Machin, 1997; Townsend, Richards, Hughes, Pinkerton, & Schwerdt, 2003). Contudo, estudos observacionais com gêmeos e língua geográfica ainda são escassos. Em 2014, um relato de caso de irmãs gêmeas monozigóticas parece ter sido a primeira publicação na literatura

nesse sentido (Shekhar, 2014). No referido trabalho, a concordância fenotípica entre o par de irmãs gêmeas MZ e a idade precoce de manifestação da GMB reforçam a participação da genética como um fator de risco a ser mais intensamente investigado (Shekhar, 2014).

Ainda no contexto da investigação genética epidemiológica, é importante ressaltar que uma estimativa da herdabilidade da língua geográfica foi realizada pela primeira vez há pouco tempo, utilizando-se como base uma população brasileira (Jorge et al., 2017). Neste trabalho, os autores estimaram que cerca de 36,6% da variação da GMB é explicada por fatores genéticos, apresentando, portanto, média herdabilidade (Jorge et al., 2017).

Dessa forma, a língua geográfica pode ser caracterizada como uma condição complexa, ou seja, dependente da interação entre diversos fatores genéticos, ambientais e comportamentais (em linguagem epidemiológica, fatores proximais e distais). Todas estas variáveis atuam em conjunto, cada qual contribuindo para uma fração do risco total da manifestação da GMB (Motulsky, 2006).

Com base nisso, na era da epidemiologia molecular, a investigação de variantes genéticas, conhecidas como *Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) tem sido realizada, principalmente em desenhos de estudo de associação do tipo observacional caso-controle (Cordell & Clayton, 2005).

Polimorfismos genéticos são conceituados como variações comuns que afetam o DNA, cuja ocorrência do alelo mais raro, em uma determinada população, é maior que 1% (Cargill et al., 1999). Estas variações podem afetar a síntese proteica e explicar a variabilidade individual frente aos diversos estímulos e doenças, bem como a manifestação de traços/condições. Nessas circunstâncias, a análise de genes candidatos continua sendo uma estratégia robusta na tentativa de elucidar mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da doença (Marian, 2012).

Nos estudos genéticos caso-controle, SNPs são estudados com o objetivo de investigar a existência de associação com doenças ou fenótipos complexos, como é o caso da GMB. O polimorfismo será considerado associado à condição se ocorrer em frequência significativamente maior em indivíduos afetados pelo

fenótipo, podendo atuar como um fator de risco, nesse caso. Quando o marcador ocorre em frequência significativamente maior no grupo controle (não afetados), é tido como fator de proteção (Cordell & Clayton, 2005).

Até o momento, há na literatura poucos estudos de associação entre SNPs e GMB (Guimarães et al., 2007; Liang et al., 2017; Scariot et al., 2017; Scariot et al., 2019). Nestes trabalhos, alguns genes ligados à resposta inflamatória do hospedeiro, como é o caso dos genes *IL1B*, *IL6*, *IL36RN* e *TNFA*, e outros relacionados à ansiedade, caso dos genes *COMT* e *5HTT*, já foram investigados. Destes, associação positiva com a GMB foi encontrada para os genes *IL1B* (Guimarães et al., 2007), *IL6* (Scariot et al., 2017), *IL36RN* (Liang et al., 2017), *COMT* e *5HTT* (Scariot et al., 2019).

Frente a isso, entende-se que novos esforços, na tentativa de elucidar outros genes e marcadores de predisposição à língua geográfica são necessários, uma vez que podem contribuir para a detecção de indivíduos mais propensos e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Além disso, por haver suspeita de forte influência da autoimunidade na patogênese desta condição, é possível especular se genes associados com a GMB podem também ser importantes para outras condições autoimunes sistêmicas, como é o caso da psoríase. Esta hipótese se justifica pelo fato de ambas as condições compartilharem muitas similaridades microscópicas (Picciani et al., 2012; Picciani et al., 2016; Tomb, Hajj, & Nehme, 2010). Sendo assim, elucidar uma possível base genética envolvida na patogênese da língua geográfica poderia contribuir sobremaneira para a comunidade científica também no contexto médico.

Uma região cromossômica que tem se mostrado promissora neste sentido é o gene *TNFAIP3* (*Tumor Necrosis Factor alpha induced protein 3*). Este gene tem sido bastante estudado no contexto das doenças autoimunes, entretanto, até o momento, não foi explorado no contexto odontológico. Por exemplo, um *Genome-wide association study* (GWAS) indicou que o *TNFAIP3* é uma região prioritária para investigação de *loci* e sua associação com a psoríase (Nair et al., 2009). Também, SNPs deste gene já foram associados com outras doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (Han et al., 2016), artrite reumatoide (Hao, Li, Liu, & Wo, 2014), síndrome de Sjogren de início precoce (Nezos et al., 2018) e a própria psoríase (Indhumathi et al., 2015).

O gene *TNFAIP3* localiza-se no cromossomo 6, região 6q23.3. Sua expressão gera como produto a proteína TNFAIP3 (proteína 3 induzida pelo Fator de Necrose Tumoral alfa, conhecida também como proteína A20) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7128>). O TNFAIP3 é um potente inibidor da via de sinalização do NF-kappa B, via esta relacionada com a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios, manutenção de resposta inflamatória crônica e morte celular (Figura 3) (Wartz et al., 2004; Verstrepen, Verhelst, Van Loo, Carpentier, Ley, & Beyaert, 2010; Li, Mooney, Xia, Gupta, Sahingur, 2020).

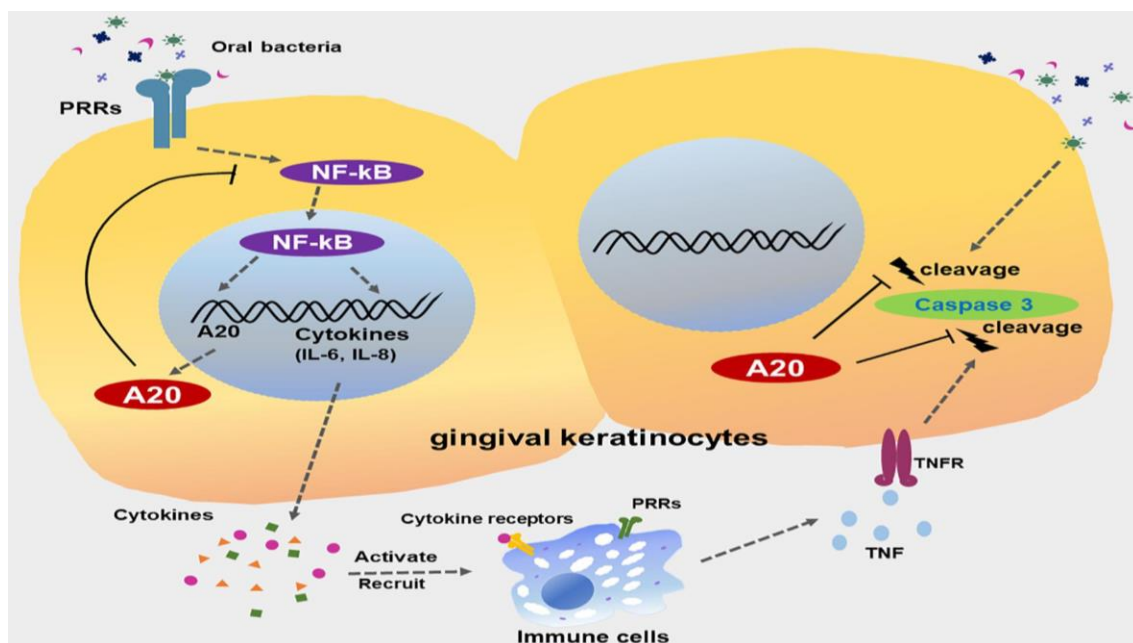


Figura 3. Ação da proteína TNFAIP3/A20 na mucosa bucal: frente à agressão bacteriana, A20 é capaz de inibir a via de sinalização NF-kappa B, modulando a resposta inflamatória em nível local. Também, é capaz de evitar a morte celular de queratinócitos gengivais ao clivar a enzima Caspase 3, a qual é indutora de apoptose. Nesse contexto, observa-se sua importância tanto para a modulação da resposta inflamatória como para a manutenção da integridade tecidual. Fonte: Li et al., 2020.

Dessa forma, a hipótese alternativa do estudo é a de existência de associação entre polimorfismos no gene candidato *TNFAIP3* e a GMB.

A estratégia de investigação nesse trabalho será através de tag SNPs (SNPs representativos de um gene). Isso permitirá realizar um mapeamento completo do gene a ser estudado, com economia de tempo e dinheiro, uma vez que, tag SNPs são SNPs em alto desequilíbrio de ligação (DL) com outros

marcadores. Sendo assim, essa condição dispensa a necessidade de genotipar todos os marcadores que de fato existem no gene, pois um tag SNP representa outros SNPs que estão em alto DL com ele mesmo.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é investigar a associação entre polimorfismos genéticos e GMB, na presença de outras variáveis clínicas, por meio de um mapeamento físico completo do gene *TNFAIP3*.

MÉTODO

Implicações éticas

Esse projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR e da UFPR, CAAE 01328412.5.0000.0020 - parecer nº 105.800 e CAAE 1002.127.10.09 - parecer 150.486, respectivamente.

Os pacientes foram informados quanto à natureza da pesquisa e então assinaram termo de consentimento livre e esclarecido após aceitarem participar do estudo.

Desenho de estudo

Estudo observacional de associação genética, em amostra caso-controle.

Amostragem

A população de estudo desta pesquisa foi oriunda das Clínicas Odontológicas do Curso de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A partir desse universo de pacientes, a amostra recrutada foi composta por 174 indivíduos, de ambos os sexos, média de idade de 33,08 ($\pm 12,13$) anos, sendo:

- i) Grupo caso: 44 pacientes com GMB em fase ativa;
- ii) Grupo controle: 130 pacientes sem GMB.

Foram incluídos no estudo pacientes não aparentados, com idade igual ou superior a 18 anos. A amostra foi pareada na proporção de 3:1 (controles:caso) para as variáveis sexo, idade e etnia. Adotou-se como critério de não inclusão pacientes com síndromes, psoríase e uso contínuo de corticoide. Foram excluídos das análises os indivíduos com material genético em quantidade insuficiente.

Avaliação sociodemográfica e clínica

Características sociodemográficas e clínicas dos pacientes foram obtidas a partir de questionários sobre seu histórico pessoal, médico e odontológico. Os parâmetros avaliados foram: idade, sexo, etnia, classificação socioeconômica, escala de ansiedade de Hamilton, presença de doença sistêmica nos indivíduos ou em familiares de primeiro grau, utilização de medicamentos, história de alergia,

tabagismo, etilismo, presença de língua fissurada e o índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) (Klein & Palmer, 1937).

A classificação socioeconômica dos indivíduos que constituíram a amostra foi realizada pelo instrumento de avaliação da ABEP (Associação Brasileira de Estudos Populacionais) do ano de 2008 (ABEP 2008). Este, através de um conjunto de indicadores específicos, tais como o número de banheiros, número de empregados domésticos em tempo integral, o número de carros de propriedade da família, posse de itens domésticos (como televisores, máquina de lavar roupa, geladeiras, entre outros), e do nível de escolaridade do chefe da família permite categorizar os pacientes nos grupos socioeconômicos A1, A2, B1, B2, C, D, e E, por meio de uma pontuação atribuída a cada indicador. A pontuação deve variar de 0 (classe E) a 34 (classe A1).

O estado emocional dos pacientes foi investigado e definido a partir de um *score*, através da escala de Hamilton (Hamilton, 1959). Nessa escala, sintomas de humor ansioso e relacionados a sintomas físicos de ansiedade foram mensurados em uma escala de intensidade que varia de 0 a 4 (0=ausente; 1=leve; 2=média; 3=forte; 4=incapacitante). Após a obtenção de *scores* parciais, estes foram somados, variando de 0 a 56, indicando por fim, um *score* final, onde <17 representava ansiedade leve, 18-24 ansiedade moderada e >25 ansiedade severa.

Seleção do gene candidato

A seleção do gene candidato foi realizada através de uma ampla busca na literatura para identificar genes importantes na autoimunidade. Em seguida, a busca foi refinada elencando-se os genes mais envolvidos com a patogênese da psoríase. Esta doença autoimune foi escolhida por apresentar alta correlação com a GMB (Picciani et al., 2016). Dessa forma, o gene *TNFAIP3* foi selecionado.

Análise genética

As células foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose 3% durante 1 minuto e raspagem da mucosa jugal com uma espátula esterilizada (Trevilatto & Line, 2000). O DNA foi extraído a partir de células epiteliais bucais com acetato de amônio 10 M e EDTA 1 mM (Aidar & Line, 2007).

Os tag SNPs dos genes candidatos foram selecionados com o auxílio da ferramenta Ferret (Tabela 1) (Limou, Taverner, & Winkler, 2016). Todos os marcadores selecionados apresentaram uma frequência alélica mínima (FAM) de 5% na população Caucasiana. O parâmetro de corte para definir desequilíbrio de ligação (DL) entre dois marcadores foi $r^2 > 80\%$. Os pacientes foram genotipados para os tag SNPs com o uso da tecnologia TaqMan® (Applied Biosystems -7500 Real-Time PCR System).

Tabela 1 Identificação dos marcadores selecionados para o estudo

Gene	Marcador	Código TaqMan®	SNP [A1/A2]
TNFAIP3	rs582757	C__8300291_10	[C/T]
	rs610604	C__884105_20	[G/T]
	rs5029930	C__44699244_10	[A/C]
	rs5029933	C__44699248_10	[A/G]

rs: reference SNP database (<http://www.ncbi.nlm.gov/sites/entrez>). Código TaqMan® específico para cada SNP (Applied Biosystems). SNP [A1/A2]: [Alelo1/Alelo2] monitorados respectivamente pelos fluoróforos VIC/FAM.

Análise estatística

Todas as análises genéticas foram realizadas avaliando-se os modelos aditivo, dominante e recessivo. O cálculo do poder da amostra foi realizado *a posteriori*, com o auxílio da calculadora do poder genético, disponível em <http://zzz.bwh.harvard.edu/gpc/cc2.html> (Purcell, Cherny & Sham, 2003). A variação do poder da amostra foi demonstrada na tabela 2. Variáveis contínuas foram descritas por média e desvio padrão. Variáveis categóricas por frequências e porcentagens. A comparação entre os grupos em relação às variáveis categóricas foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson. A associação entre variáveis contínuas foi estimada pelo teste t de *Student* para amostras independentes. Para a análise genotípica, os grupos foram comparados por regressão logística binária, realizando-se correção de Bonferroni para múltiplos testes (o nível de significância para as análises genéticas univariadas foi ajustado para $p < 0,008$, obtido por $0,05 / 2$ marcadores informativos * 3 modelos genéticos testados). Estimativas de risco foram obtidas por *odds ratio* (OR) com intervalos de confiança de 95%. A análise multivariada foi realizada ajustando-se um modelo de regressão logística, incluindo variáveis com valor de $p < 0,20$ na análise univariada,

utilizando-se o método *backward*. O nível de significância estatística adotado foi $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo software IBM SPSS® v.20.0. O Haploview® 4.2 foi utilizado para estimar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os tag SNPs.

Tabela 2 Cálculo do poder da amostra, usando a calculadora do poder genético (Purcell et al. 2003), fixando como parâmetros: $D'=1$, frequência do alelo raro variando de 26,4% a 31,8% (baseado na FAM dos marcadores informativos – rs582757 e rs610604, respectivamente), prevalência de GMB de 7% e nível de significância de 5%, com a variação do poder sendo dependente do risco relativo do alelo raro.

Tamanho do efeito	rs582757		rs610604	
	Poder	n de casos para poder de 80%	Poder	n de casos para poder de 80%
1,5	0,122	556	0,105	730
2	0,257	202	0,210	260
3	0,563	76	0,466	98
4	0,777	46	0,675	59
5	0,890	33	0,808	43

RESULTADOS

Análise sociodemográfica e clínica

Nenhuma associação foi encontrada entre GMB e idade, sexo, etnia, *status* socioeconômico, doenças sistêmicas, doenças sistêmicas nos familiares de primeiro grau, medicamentos de uso contínuo, alergias, fumo e consumo de álcool ($p>0,05$). Entretanto, maior *score* para ansiedade ($p=0,001$), presença de língua fissurada ($p=3,7*10^{-15}$; OR=107,5; IC: 13,76 – 839,3) e maior índice CPOD ($p=0,002$) foram associados com a GMB (Tabela 3).

Tabela 3 Resultado da análise univariada para parâmetros sociodemográficos e clínicos (grupo caso n=44; grupo controle n=130)

Variável	Grupos		p-valor	OR (IC 95%)
	Caso	Controle		
Idade ^a	33,7 (12,5)	32,8 (12)	0,694	—
Sexo ^b				
Masculino	19 (43,2)	58 (44,6)	0,869	0,94 (0, 47 – 1,88)
Feminino	25 (56,8)	72 (55,4)		
Etnia ^b				
Caucasiano	38 (86,4)	114 (87,7)	0,819	1,12 (0,41 – 3,08)
Não Caucasiano	6 (13,6)	16 (12,3)		
Status socioeconômico ^b				
A1/A2/B1/B2	9 (20,5)	35 (26,9)	0,394	1,43 (0,62 – 3,28)
C1/C2/D/E	35 (79,5)	95 (73,1)		

Ansiedade ^a	13,9 (8,6)	9,0 (6,1)	0,001	—
Doenças sistêmicas ^b				
Não	21 (47,7)	69 (53,1)	0,539	1,23 (0,62 – 2,45)
Sim	23 (52,3)	61 (46,9)		
Doenças sistêmicas – familiares de 1º grau ^b				
Não	8 (18,2)	33 (25,4)	0,331	1,53 (0,64 – 3,62)
Sim	36 (81,8)	97 (74,6)		
Medicação contínua ^b				
Não	19 (43,2)	65 (50)	0,434	1,31 (0,66 – 2,61)
Sim	25 (56,8)	65 (50)		
Alergias ^b				
Não	32 (72,7)	95 (73,1)	0,964	1,01 (0,47 – 2,19)
Sim	12 (27,3)	35 (26,9)		
Fumo ^b				
Não	39 (88,6)	122 (93,8)	0,256	1,95 (0,60 – 6,32)
Sim	5 (11,4)	8 (6,2)		
Consumo de álcool ^b				
Não	24 (54,5)	66 (50,8)	0,665	0,85 (0,43 – 1,70)
Sim/Socialmente	20 (45,5)	64 (49,2)		

Língua fissurada ^b				
Não	24 (54,5)	129 (99,2)	3,7*10⁻¹⁵	107,5 (13,76 – 839,3)
Sim	20 (45,5)	1 (0,8)		
Índice CPOD ^a	11,9 (7,4)	7,9 (6,8)	0,002	—

^a Média (Desvio Padrão) - comparação entre os grupos realizada pelo teste t de *Student* para amostras independentes

^b n (%) – comparação entre os grupos pelo teste qui-quadrado de Pearson

Análise genética univariada

Todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. Dois tag SNPs foram associados com a GMB após a correção de Bonferroni ($p < 0,008$): rs582757 no modelo dominante para o alelo C ($p = 0,007$; OR=2,90; IC: 1,33 – 6,34); e o alelo G do rs610604 no modelo aditivo ($p = 0,006$; OR=4,02; IC:1,49 – 10,83) e no modelo dominante ($p = 0,004$; OR=4,05; IC: 1,55 – 10,55) (Tabela 4). Também, os dois marcadores associados na análise univariada estavam em considerável DL (74%; Figura 4), indicando um bom grau de dependência entre esses polimorfismos na amostra avaliada.

Tabela 4 Resultado da análise genética univariada (grupo caso n=44; grupo controle n=130)

dbSNP ^a	Modelo Genético	Genótipo	Grupos - n (%)		p-valor ^b	OR (IC 95%)
			Caso	Controle		
rs582757	Aditivo	TT	11 (27,5)	64 (52,5)	0,027	—
		CT	26 (65)	52 (42,6)	0,008	2,90 (1,31 – 6,43)
		CC	3 (7,5)	6 (4,9)	0,170	2,90 (0,63 – 13,38)
	Dominante T	TT + CT	37 (92,5)	116 (95,1)	0,539	1,56 (0,37 – 6,58)
		CC	3 (7,5)	6 (4,9)		
	Recessivo T	CC + CT	29 (72,5)	58 (47,5)	0,007	2,90 (1,33 – 6,34)
rs610604	Aditivo	TT	11 (27,5)	64 (52,5)		
		GG	6 (18,8)	14 (11,7)	0,029	4,14 (1,16 – 14,80)
		GT	20 (62,5)	48 (40)	0,006	4,02 (1,49 – 10,83)
		TT	6 (18,8)	58 (48,3)	0,016	—

	Dominante G	GG + GT TT	26 (81,3) 6 (18,8)	62 (51,7) 58 (48,3)	0,004	4,05 (1,55 – 10,55)
	Recessivo G	TT + GT GG	26 (81,3) 6 (18,8)	106 (88,3) 14 (11,7)	0,297	1,74 (0,61 – 4,98)
	Aditivo	AA AC CC	33 (89,2) 4 (10,8) 0	102 (83,6) 20 (16,4) 0	0,410	1,61 (0,51 – 5,07)
rs5029930	Dominante A	AA + AC CC	37 (100) 0	122 (100) 0	–	–
	Recessivo A	CC + AC AA	4 (10,8) 33 (89,2)	20 (16,4) 102 (83,6)	0,410	1,61 (0,51 – 5,07)
	Aditivo	AA AG GG	41 (95,3) 2 (4,7) 0	118 (92,9) 9 (7,1) 0	0,578	1,56 (0,32 – 7,53)
rs5029933	Dominante A	AA + AG GG	43 (100) 0	127 (100) 0	–	–
	Recessivo A	GG + AG AA	2 (4,7) 41 (95,3)	9 (7,1) 118 (92,9)	0,578	0,64 (0,13 -3,08)

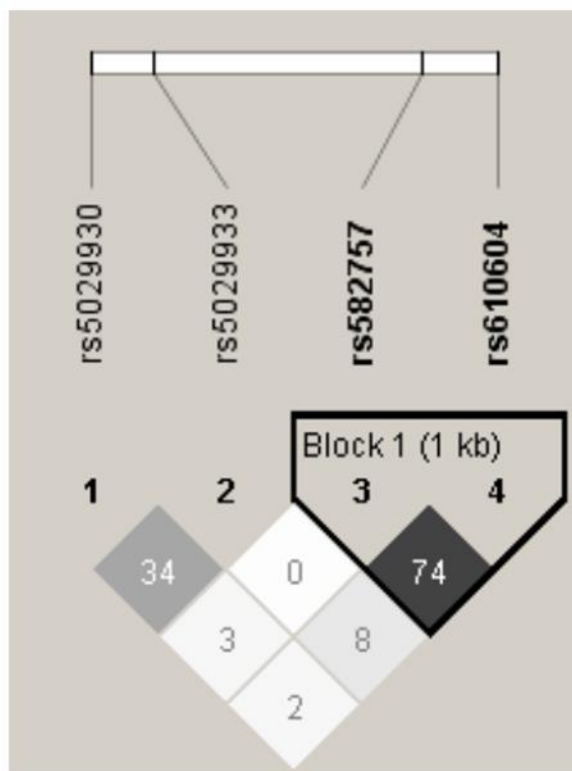
^a Indetificador do SNP baseado na base de dados do NCBI

^b Regressão logística binária

Os diferentes valores de n refrem-se a falhas na genotipagem

O rs5029930 e rs5029933 não foram considerados na correção de Bonferroni por apresentarem baixa frequência do alelo raro na amostra. Portanto, eles foram considerados não informativos.

Figura 4 Análise do DL entre os tag SNPs do gene *TNFAIP3* para a população estudada. O número dentro dos quadrados indica a proporção de DL entre dois marcadores em %. A intensidade da cor dos quadrados reflete o grau de DL entre dois *loci* (quadrado mais escuro representa maior DL entre dois SNPs).



Análise multivariada

Após o ajuste do modelo de regressão para múltiplas variáveis, associação foi mantida para os seguintes fatores de risco: presença de língua fissurada ($p=2,4*10^{-5}$; OR=130,11; IC:13,56 – 1248,42), maior score para ansiedade ($p=0,003$) e o rs610604 no modelo dominante para o alelo G ($p=0,025$; OR 4,58; IC:1,20 – 17,43) (Tabela 5).

Tabela 5 Resultado da análise multivariada (grupo caso n=44; grupo controle n=130)

Variável	Grupos		p-valor	OR (IC 95%)
	Caso	Controle		
Língua fissurada ^a				
Não	24 (54,5)	129 (99,2)	2,4*10⁻⁵	130,11 (13,56 – 1248,42)
Sim	20 (45,5)	1 (0,8)		
Ansiedade ^b	13,9 (8,6)	9,0 (6,1)	0,003	—
rs610604 ^a				
GG + GT	26 (81,3)	62 (51,7)	0,025	4,58 (1,20 – 17,43)
TT	6 (18,8)	58 (48,3)		

^a n (%)

^b Média (Desvio Padrão)

O rs610604 (modelo dominante para o alelo G) apresentou diferentes valores de n devido à falha na genotipagem

DISCUSSÃO

A GMB é uma condição inflamatória inespecífica, cuja etiologia ainda não é perfeitamente compreendida (Shareef & Etefagh, 2020). Ela afeta o dorso da língua, principalmente com desqueratinização, atividade celular imune e consequente perda das papilas filiformes da mucosa lingual (Mangold et al., 2016).

Aqui, nenhuma associação foi encontrada para sexo, idade e etnia. A associação entre sexo e GMB ainda não é bem definida, uma vez que diferentes autores discordam sobre a predileção por sexo (Germi et al., 2012; Netto, Dias, Garcia, Amaral, Miranda, & Pires, 2019; Shareef & Etefagh, 2020). Com relação à idade, a GMB parece ser mais comum em adultos jovens (Jorge et al., 2017; Oyetola, Oluwande, & Agho, 2018; Shareef & Etefagh, 2020).

Neste estudo, maior grau de ansiedade associou-se com GMB tanto na análise univariada como na análise multivariada. Este achado já era esperado pelo fato de a ansiedade ser considerada um importante fator de risco previamente relatado na literatura (Alikhani, Khalighinejad, Ghalaiani, Khaleghi, Askari, & Gorsky, 2014; González-Alvarez, García-Pola, & Garcia-Martin, 2018; Scariot et al., 2019). Nesse contexto, vale ressaltar a possibilidade de haver forte correlação entre saúde bucal e saúde mental, uma vez que, pessoas com distúrbios mentais (incluindo ansiedade e depressão) têm até 2,7 vezes mais chances de perder todos os dentes quando comparadas com a população em geral. Isso pode se justificar por diversos fatores, como: ingestão alimentar mais frequente, maus hábitos de higiene bucal (tanto no aspecto quantitativo como qualitativo), uso de substâncias tóxicas e dificuldades financeiras para acessar cuidados odontológicos profissionais (Kisely, 2016). Além disso, muitos destes pacientes estão submetidos à terapia medicamentosa com drogas que podem produzir xerostomia e/ou hipossalivação, aumentando assim, as chances de desenvolvimento de doenças bucais (Kisely, 2016). Corroborando a esta hipótese, de fato, nossos achados revelaram um maior índice CPOD associado com o desfecho. Isso pode sugerir a sobreposição de fatores predisponentes nos pacientes estudados, conforme observado na análise multivariada, reforçando a multicausalidade envolvida na etiopatogênese da língua geográfica.

A presença de língua fissurada foi outro parâmetro fortemente associado com a GMB, como tem sido observado em trabalhos anteriores (Mangold et al.,

2016; Scariot et al., 2017; Picciani et al., 2017; Netto et al., 2019). Uma hipótese capaz de explicar esta associação baseia-se no fato de que o principal achado de amostras biopsadas de língua fissurada revelam infiltrado subepitelial predominantemente de leucócitos e linfócitos, associado a edema do tecido subjacente (Järvinen, Mikkonen, & Kullaa, 2014). O processo inflamatório causador do edema, típico e presente na GMB, produz um aumento da espessura do tecido conjuntivo, o que poderia induzir a quebra das fibras musculares da língua gerando, como consequência, as fissuras linguais clinicamente visíveis (Järvinen et al., 2014).

Com relação aos achados genéticos, acredita-se que por se tratar de um fenótipo ligado à autoimunidade, um conjunto de genes específicos está mais intimamente envolvido com a modulação da suscetibilidade individual a estas doenças. Nesse sentido, este estudo focou na investigação do *TNFAIP3* por ser um gene frequentemente associado com comorbidades autoimunes (Hao et al., 2014; Indhumathi et al., 2015; Han et al., 2016; Nezos et al., 2018). Na análise genética realizada, importantes achados foram detectados para o rs582757 e rs610604. Os dois polimorfismos relatados apresentaram relevantes associações na análise univariada, mesmo após a correção de Bonferroni para múltiplos testes. Ainda, após a análise multivariada, a associação foi mantida para o rs610604 no modelo dominante para o alelo G. Importante salientar que estes dois marcadores possuem considerável grau de dependência (DL = 74%) na população estudada, o que sugere um único sinal de associação. Dessa forma, estes dois tag SNPs podem ser importantes marcadores moleculares para a GMB.

Interessantemente, o rs582757 e o rs610604, foram as principais variantes associadas em meta-análises do *TNFAIP3*, revelando que estes marcadores são importantes SNPs preditores de risco para a psoríase (Nititham et al., 2015; Gong, Gao, Pu, Kang, & Wu, 2020). Frente a isso, um fato curioso intrigou o nosso grupo de pesquisa: estes polimorfismos estão localizados em região de íntron, o que nos leva a crer, em um primeiro momento, que estes SNPs não são funcionais. Contudo, frente ao robusto nível de evidência científica, como as meta-análises citadas, acreditamos que estes dois polimorfismos podem, de fato, possuir algum impacto funcional na síntese proteica, especialmente na fase de processamento do RNAm do *TNFAIP3*, havendo algum grau de dificuldade na remoção dos íntrons

e união dos éxons quando estas variantes genéticas estão presentes (Abramowicz & Gos, 2018). Como essa hipótese carece de elevado nível de evidência científica, um estudo funcional, como análise de expressão gênica por exemplo, seria de grande valor neste contexto (Abramowicz & Gos, 2018), tanto para melhor compreender o papel deste gene no fenótipo aqui estudado como em outros fenótipos ligados à autoimunidade.

Nesse sentido, a proteína TNFAIP3 ganha destaque por ser um transcrito de resposta primária ao TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), restringindo as respostas inflamatórias. Essa proteína atua como um regulador de *feedback* negativo da via de sinalização NF-kappa B, a qual é ativada frente a múltiplos estímulos, como a presença de TNF, interleucina 1 e ação de receptores do tipo *Toll-like* (Verstrepen et al., 2010; Vereecke, Beyaert, & Van Loo, 2011; Li et al., 2019). Também, a deficiência de TNFAIP3 tem sido associada com inflamação crônica e dano tecidual em vários modelos de doenças, como linfoma na síndrome de Sjögren primária (Johnsen et al., 2016), periodontite (Li et al., 2019) e psoríase (Aki, Nagasaki, Malynn, Ma & Kagari, 2017). Além disso, ansiedade psicológica já foi correlacionada com níveis alterados de expressão de RNAm do *TNFAIP3* (Chen, Huang, Huang, & Hung, 2018). Tal associação com ansiedade pode se justificar pelo fato de que pacientes ansiosos e deprimidos tendem a apresentar respostas inflamatórias mais exacerbadas quando comparados com pacientes sem distúrbios mentais (Osimo, Cardinal, Jones, & Khandaker, 2018).

Por fim, este trabalho apresenta algumas limitações, a se reconhecer: i) necessidade de replicação das análises em amostras populacionais maiores e independentes (mais homogêneas); neste estudo utilizou-se um modesto n amostral, sendo mandatório confirmar as associações genéticas aqui encontradas. Isso se deve ao fato de que nem toda associação estatisticamente significativa é biologicamente relevante. Além disso, após confirmada a associação biológica destes SNPs é fundamental avaliar se a relevância biológica se mantém para as diferentes populações, uma vez que essas possuem diferentes *backgrounds* genéticos; ii) dificuldade de obter uma excelente caracterização dos pacientes controles, a qual poderia ser superada com o recrutamento dos pais dos indivíduos afetados, permitindo assim a análise dos trios (análise de famílias), agregando dessa forma, mais uma metodologia para reforçar a confirmação da hipótese

alternativa; iii) a seleção dos tag SNPs, que foi realizada com base na população Caucasiana e idealmente deveria ser realizada com base na população Brasileira, porém esta não está catalogada. A população CEU foi utilizada por acreditarmos ser a mais similar com a população estudada. Porém, o uso desta população gera uma pequena chance de cobertura incompleta do gene, o que devido aos achados positivos não impacta significativamente nas conclusões reportadas. Caso se julgue necessário, uma maneira interessante de superar esta eventual limitação seria mapear os tag SNPs tanto da população Caucasiana como da população Africana, devido à forte miscigeneção que ocorre na população Brasileira. A população Africana é considerada mais ancestral e mais fragmentada em termos de DL, necessitando muitas vezes de mais tag SNPs para a cobertura completa do gene. Contudo, isto cria a possibilidade de análise de SNPs redundantes, realização de múltiplos testes estatísticos, aumentando-se as chances de cometer um erro do tipo I (aceitar a hipótese alternativa como verdadeira quando na verdade ela é falsa). Dessa forma, o delineamento do estudo, com critérios adequados de seleção dos SNPs, é fundamental para alcançar os objetivos propostos e minimizar as chances de cometer erros do tipo I (detectar associações espúrias ao aceitar H_1 e rejeitar H_0) ou erros do tipo II (rejeitar H_1 - seja por falta de *power* estatístico ou por analisar um número muito grande de variantes genéticas e precisar de correções matemáticas para múltiplos testes).

CONCLUSÃO

Neste trabalho associações bem conhecidas entre GMB e ansiedade e língua fissurada foram reforçadas. Uma associação entre índice CPOD e o desfecho foi, até o momento, unicamente reportada pelo presente grupo de pesquisa. De maneira inédita, sugere-se que os polimorfismos rs582757 e rs610604 podem ser importantes preditores de risco para a língua geográfica.

REFERÊNCIAS

- ABEP (2008) Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB). Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP).
- Abramowicz, A., & Gos, M. (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics*, 59(3), 253-268. doi:10.1007/s13353-018-0444-7
- Aidar, M., & Line, S. R. P. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal*, 18(2), 148–152.
- Aki, A., Nagasaki, M., Malynn, B.A., Ma, A., Kagari, T. (2017). Hypomorphic A20 expression confers susceptibility to psoriasis. *PLoS One*, 12, 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180481>
- Alikhani, M., Khalighinejad, N., Ghalaiani, P., Khaleghi, M.A., Askari, E., Gorsky, M. (2014). Immunologic and psychologic parameters associated with geographic tongue. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, 118, 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.03.007>
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., ... Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*, 22(3), 231–238. <https://doi.org/10.1038/10290>
- Chen, R.A., Huang, T.L., Huang, K.W., & Hung, Y.Y. (2018). TNFAIP3 mRNA Level Is Associated with Psychological Anxiety in Major Depressive Disorder. *Neuroimmunomodulation*, 24, 271–275. <https://doi.org/10.1159/000486860>
- Cordell, H. J., & Clayton, D. G. (2005). Genetic association studies. *Lancet (London, England)*, 366(9491), 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67424-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67424-7)
- Espelid, M., Bang, G., Johannessen, A. C., Leira, J. I., & Christensen, O. (1991). Geographic stomatitis: report of 6 cases. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 20(9), 425–428. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1991.tb00432.x>
- Germi, L., de Giorgi, V., Bergamo, F., ... Fornasa, C.V. (2012). Psoriasis and oral lesions: Multicentric study of oral mucosa diseases italian group (GIPMO). *Dermatology Online Journal*, 18(1), 11.

- Gong, H.B., Gao, S.T., Pu, X.M., Kang, X.J., & Wu, X.J. (2020). Association of rs610604 in TNFAIP3 and rs17728338 in TNIP1 gene polymorphisms with psoriasis susceptibility: a meta-analysis of case-control studies. *BMC Medical Genetics*, 21(1), 103. doi:10.1186/s12881-020-01041-x
- González-Álvarez, L., García-Pola, M.J., & Garcia-Martin, J.M. (2018). Geographic tongue: Predisposing factors, diagnosis and treatment. A systematic review. *Revista Clínica Española*, 218, 481–488.
- Guimarães, A. L. S., Correia-Silva, J. D. F., Diniz, M. G., Xavier, G. M., Horta, M. C. R., & Gomez, R. S. (2007). Investigation of functional gene polymorphisms: IL-1B, IL-6 and TNFA in benign migratory glossitis in Brazilian individuals. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 36(9), 533–537. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00559.x>
- Hamilton, M. (1959). The assessment of anxiety states by rating. *The British Journal of Medical Psychology*, 32(1), 50–55.
- Han, J. W., Wang, Y., Li, H. B., Alateng, C., Bai, Y. H., Sun, Z. Q., ... Wu, R. N. (2016). Single nucleotide polymorphisms of TNFAIP3 are associated with systemic lupus erythematosus in Han Chinese population. *International Journal of Immunogenetics*, 43(2), 96–100. <https://doi.org/10.1111/iji.12250>
- Hao, G., Li, Y., Liu, J., & Wo, M. (2014). TNFAIP3 rs2230926 polymorphisms in rheumatoid arthritis of southern Chinese Han population: a case-control study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8958–8961.
- Huamei, Y., Yu, Z., Xin, Z., Ga, L., & Qianming, C. (2015). [Research progress on the risk factors of geographic tongue]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of Stomatology*, 33(1), 93–97.
- Indhumathi, S., Rajappa, M., Chandrashekar, L., Ananthanarayanan, P. H., Thappa, D. M., & Negi, V. S. (2015). TNFAIP3 and TNIP1 polymorphisms confer psoriasis risk in South Indian Tamils. *British Journal of Biomedical Science*, 72(4), 168–173. <https://doi.org/10.1080/09674845.2015.11665748>
- Järvinen, J., Mikkonen, J.J.W., & Kullaa, A.M. (2014). Fissured tongue: A sign of tongue edema? *Medical Hypotheses*, 82, 709–712.

<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.03.010>

- Johnsen, S.J.A., Gudlaugsson, E., Skaland, I., ... Omdal, R. (2016). Low Protein A20 in Minor Salivary Glands is Associated with Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, 83, 181–187. <https://doi.org/10.1111/sji.12405>
- Jorge, M. A., Gonzaga, H. F. de S., Tomimori, J., Picciani, B. L. S., & Barbosa, C. A. (2017). Prevalence and heritability of psoriasis and benign migratory glossitis in one brazilian population. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(6), 816–819. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20176389>
- Kisely, S. (2016). No mental health without oral health. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 61, 277–282.
- Klein, H., & Palmer, C.E. (1937). Dental caries in American indian children. *Public Health Bulletin*, 239,1-54.
- Koay, C. L., Lim, J. A., & Siar, C. H. (2011). The prevalence of tongue lesions in Malaysian dental outpatients from the Klang Valley area. *Oral Diseases*, 17(2), 210–216. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01724.x>
- Li, Y., Mooney, E.C., Holden, S.E., ... Sahingur, S.E. (2019). A20 Orchestrates Inflammatory Response in the Oral Mucosa through Restraining NF-κB Activity. *The Journal of Immunology*, 202, 2044–2056. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801286>
- Li, Y., Mooney, E.C., Xia, X.J., Gupta, N., & Sahingur, S.E. (2020). A20 Restricts Inflammatory Response and Desensitizes Gingival Keratinocytes to Apoptosis. *Frontiers in Immunology*, 11, 365. doi:10.3389/fimmu.2020.00365
- Liang, J., Huang, P., Li, H., Zhang, J., Ni, C., Wang, Y., ... Yao, Z. (2017). Mutations in IL36RN are associated with geographic tongue. *Human Genetics*, 136(2), 241–252. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1750-y>
- Limou, S., Taverner, A. M., & Winkler, C. A. (2016). Ferret: a user-friendly Java tool to extract data from the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics*, 32(14), 2224–2226. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw147>
- Mangold, A. R., Torgerson, R. R., & Rogers, R. S. (2016). Diseases of the tongue. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.018>

- Marian, A. J. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 159(2), 64–79. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.08.001>
- Martin, N., Boomsma, D., & Machin, G. (1997). A twin-pronged attack on complex traits. *Nature Genetics*, 17(4), 387–392. <https://doi.org/10.1038/ng1297-387>
- Miloğlu, Ö.; Göregen, M., Akgül, H. M., & Acemoğlu, H. (2009). The prevalence and risk factors associated with benign migratory glossitis lesions in 7619 Turkish dental outpatients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 107(2), e29–e33. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.10.015>
- Motulsky, A. G. (2006). Genetics of complex diseases. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(2), 167–168. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0167>
- Nair, R. P., Duffin, K. C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P. E., Goldgar, D., ... Collaborative Association Study of Psoriasis. (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nature Genetics*, 41(2), 199–204. <https://doi.org/10.1038/ng.311>
- Netto, J.N.S., Dias, M.C., Garcia, T.R., Amaral, S.M., Miranda, Á.M., & Pires, F.R. (2019). Geographic stomatitis: An enigmatic condition with multiple clinical presentations. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 11, e845–e849. <https://doi.org/10.4317/jced.55758>
- Nezos, A., Gkioka, E., Koutsilieris, M., Voulgarelis, M., Tzioufas, A. G., & Mavragani, C. P. (2018). TNFAIP3 F127C coding variation in Greek primary sjogren's syndrome patients. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6923213>
- Nititham, J., Taylor, K.E., Gupta, R., ... Liao, W. (2015). Meta-analysis of the TNFAIP3 region in psoriasis reveals a risk haplotype that is distinct from other autoimmune diseases. *Genes & Immunity*, 16, 120–126. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.75>
- Osimo, E.F., Cardinal, R.N., Jones, P.B., & Khandaker, G.M. (2018). Prevalence and correlates of low-grade systemic inflammation in adult psychiatric inpatients: An electronic health record-based study.

- Oyetola, E.O., Oluwande, A., & Agho, E.T. (2018). Geographic Tongue: Pattern of presentation in a South Western nigerian teaching hospital. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 16, 131–135.
- Pass, B., Brown, R. S., & Childers, E. L. B. (2005). Geographic tongue: Literature review and case reports. *Dentistry Today*, 24(8), 54–57.
- Picciani, B. L. S., Domingos, T. A., Teixeira-Souza, T., dos Santos, V. de C. B., Gonzaga, H. F. de S., Cardoso-Oliveira, J., ... Carneiro, S. (2016). Geographic tongue and psoriasis: Clinical, histopathological, immunohistochemical and genetic correlation –a literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(4), 410–421. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164288>
- Picciani, B., Silva-Junior, G., Carneiro, S., Sampaio, A. L., Goldemberg, D. C., Oliveira, J., ... Dias, E. P. (2012). Geographic stomatitis: an oral manifestation of psoriasis? *Journal of Dermatological Case Reports*, 6(4). <https://doi.org/10.3315/jdcr.2012.1118>
- Picciani, B., Santos, V. de C., Teixeira-Souza, T., ... Dias, E. (2017). Investigation of the clinical features of geographic tongue: unveiling its relationship with oral psoriasis. *International Journal of Dermatology*, 56, 421–427. <https://doi.org/10.1111/ijd.13460>
- Purcell, S., Cherny, S.S., Sham, P.C. (2003). Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*, 19, 149–50.
- Redman, R. S., Shapiro, B. L., & Gorlin, R. J. (1972). Hereditary Component in the Etiology of Benign Migratory Glossitis. *Amer J Hum Genet*, 24(2), 124–133.
- Rezaei, F., Safarzadeh, M., Mozafari, H., & Tavakoli, P. (2015). Prevalence of Geographic tongue and Related Predisposing Factors in 7-18 Year-Old Students in Kermanshah, Iran 2014. *Global Journal of Health Science*, 7(5), 91–95. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n5p91>
- Scariot, R., Batista, T. B. D., Olandoski, M., Souza, C. M., Souza, P. H. C., Lima, A. A. S., & Trevilatto, P. C. (2017). Host and clinical aspects in patients with benign migratory glossitis. *Archives of Oral Biology*, 73, 259–268.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.027>

- Scariot, R., Sebastiani, A.M., Meger, M.N., ... Trevilato, P.C. (2019). Anxiety and genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and serotonin transportation gene (5HTT) are associated with benign migratory glossitis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*, 127, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.10.011>
- Shareef, S., & Etefagh, L. (2020). Geographic Tongue. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554466/>. Accessed on May 20, 2020.
- Shekhar M, G. (2014). Geographic tongue in monozygotic twins. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(4), ZD01-2. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7512.4210>
- Shulman, J. D., & Carpenter, W. M. (2006). Prevalence and risk factors associated with geographic tongue among US adults. *Oral Diseases*, 12(4), 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01208.x>
- Tomb, R., Hajj, H., & Nehme, E. (2010). [Oral lesions in psoriasis]. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 137(11), 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2010.08.006>
- Tortorici, S., Corrao, S., Natoli, G., & Difalco, P. (2016). Prevalence and distribution of oral mucosal non-malignant lesions in the western Sicilian population. *Minerva Stomatologica*, 65(4), 191–206.
- Townsend, G., Richards, L., Hughes, T., Pinkerton, S., & Schwerdt, W. (2003). The value of twins in dental research. *Australian Dental Journal*, 48(2), 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2003.tb00014.x>
- Trevilatto, P. C., & Line, S. R. (2000). Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of Forensic Odontostomatology*, 18(1), 6–9.
- Vereecke, L., Beyaert, R., & Van Loo, G. (2011). Genetic relationships between A20/TNFAIP3, chronic inflammation and autoimmune disease. *In: Biochemical Society Transactions*, pp 1086–1091.
- Verstrepen, L., Verhelst, K., Van Loo, G., Carpentier, I., Ley, S. C., & Beyaert, R.

(2010). Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.044>

Villanueva-Vilchis, M.-C., López-Ríos, P., García, I.-M., & Gaitán-Cepeda, L.-A. (2016). Impact of oral mucosa lesions on the quality of life related to oral health. An etiopathogenic study. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 21(2), e178-84. <https://doi.org/10.4317/MEDORAL.20866>

Wartz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., ... Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature*, 430(7000), 694–699. <https://doi.org/10.1038/nature02794>

ANEXOS

ARTIGO EM INGLÊS

Title page

A case-control study suggests *TNFAIP3* as a new genetic risk factor for Benign Migratory Glossitis

Thaís Munhoz Pereira¹ | Rafaela Scariot de Moraes² | Laís Cristina Giacobbo¹ | Laysa Toschi Martins³ | Marcelo Távora Mira^{1,3} | Paula Cristina Trevilatto^{1,3}

Authors' affiliations:

¹Thaís Munhoz Pereira, Laís Cristina Giacobbo, Paula Cristina Trevilatto and Marcelo Távora Mira: School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil;

²Rafaela Scariot de Moraes: Department of Dentistry, Universidade Positivo (UP), Curitiba, PR, Brazil;

³Laysa Toschi Martins, Marcelo Távora Mira and Paula Cristina Trevilatto: School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brazil.

Author's Contributions:

Rafaela Scariot de Moraes and Paula Cristina Trevilatto conceived and designed the study;

Rafaela Scariot de Moraes collected the data and performed DNA extractions;

Thaís Munhoz Pereira, Laís Cristina Giacobbo and Laysa Toschi Martins performed genotyping;

Thaís Munhoz Pereira, Marcelo Távora Mira and Paula Cristina Trevilatto analyzed the data and participated on the writing of the manuscript.

Corresponding author:

D. Paula Cristina Trevilatto – ORCID ID 0000-0001-5781-8629

School of Life Sciences

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Rua Imaculada Conceição, 1155

Curitiba, PR, CEP: 80215-901

Brazil

Tel: +55 41 3271-2582

e-mail: paula.trevilatto@pucpr.br

Acknowledgments:

The study was supported by a Grant from Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, CAPES Scholarship and CNPq grant.

Abstract

Objectives The aim of this study was to investigate association between clinical variables and genetic polymorphisms of *TNFAIP3* and Benign Migratory Glossitis (BMG).

Material and Methods This study was carried out with 174 individuals: 44 cases and 130 controls, all 18 years old or older. Four tag SNPs in the *TNFAIP3* were genotyped using TaqMan technology. Data were analyzed using univariate and multivariate analyses.

Results In the univariate analysis, anxiety ($p=0.001$), fissured tongue ($p=3.7 \times 10^{-15}$; OR=107.5; CI: 13.76 - 839.3), and DMFT index ($p=0.002$) were associated with BMG. Markers rs582757 under a dominant model for allele C ($p=0.007$; OR=2.90; CI: 1.33 - 6.34) and rs610604 under both additive ($p=0.006$; OR=4.02; CI:1.49 - 10.83) and dominant model for allele G ($p=0.004$; OR=4.05; CI: 1.55 - 10.55) were associated. In the multiple regression model, association was maintained for fissured tongue ($p=2.4 \times 10^{-5}$; OR=130.11; CI:13.56 - 1248.42), anxiety ($p=0.003$), and rs610604 under the dominant model for the G allele ($p=0.025$; OR 4.58; CI:1.20 - 17.43).

Conclusions It is suggested that variants rs582757 and rs610604 of *TNFAIP3* may be genetic risk markers for BMG. Also, DMFT index, anxiety and fissured tongue were associated.

Clinical relevance SNPs in *TNFAIP3* may be risk factors for BMG. Molecular epidemiology can be useful to help in the development of alternative therapeutic approaches to symptomatic cases and to improve the quality of life of those patients affected.

Keywords: *TNFAIP3*, genetic polymorphisms, benign migratory glossitis, case-control study

Introduction

Benign migratory glossitis (BMG) is a non-specific chronic inflammatory condition, clinically characterized by erythematous erosions surrounded by a whitish halo. Such characteristics reflect the loss of the filiform papillae of the dorsum of the tongue [1]. Although most of the affected patients report only discomfort due to a burning mouth sensation, lesions in the oral mucosa can be important indicators of oral health and quality of life [2]. Cross-sectional studies have detected different epidemiological rates in the different countries: prevalence of BMG has been estimated as 1.8% in North America [3]; 1.5% in Turkey [4]; 2.2% in Malaysia [5], 7.86% in Iran [6], 1% in Italy [7] and 7% in Southeast Brazil [8].

The etiology of BMG remains unclear; however, several factors associated with its manifestation have been suggested, such as stress and anxiety, smoking, hormonal disorders, coexistence of fissured tongue, diabetes mellitus, tendency to allergy, psoriasis, among others [9]. In addition, the participation of immunological and genetic modulation in the pathogenesis of this condition has been suggested [9,10,11].

Gene *TNFAIP3* is located on chromosomal region 6q23.3. Its expression generates Protein 3 Induced by the Tumor Necrosis Factor-Alpha, also known as protein A20 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7128>). *TNFAIP3/A20* is a potent inhibitor of the NF-kappa B signaling pathway, which is related to the transcription of several pro-inflammatory genes, maintenance of chronic inflammatory response and cell death. Also, It modulates signals from TNF- alpha and IL1-beta [12, 13]. Genetic polymorphisms of *TNFAIP3* have been associated with autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus [14], rheumatoid arthritis [15], Sjogren's syndrome [16], and psoriasis [17].

Considering that there are several microscopic similarities between BMG and psoriasis lesions [10], the alternative hypothesis of this study is the existence of association between *TNFAIP3* polymorphisms and BMG. Thus, the aim of this work was to investigate the association between genetic polymorphisms and BMG, in the presence of clinical variants, through a complete physical mapping of the *TNFAIP3* gene.

Material and Methods

Ethical considerations

This case-control study was approved by the Ethics Committee on Research of the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) and of Federal University of Paraná (UFPR), protocols 01328412.5.0000.0020 and 1002.127.10.09, respectively, in accordance with the Helsinki Declaration. All patients were informed about the nature of the research and signed a free and informed consent form accepting to participate in the study.

Sampling

The study population was enrolled at the Dental Clinics at PUCPR/UFPR during 2012 and 2013. From the universe of patients treated along these years, the sample was composed of 174 individuals, of both sexes, unrelated, with 18 years-old or over. The study group (SG) was consisted of 44 patients with BMG in the active phase; the control group (CG) presented 130 patients without BMG. The sample was matched in order to achieve a 3:1 ratio (controls:case) for covariates sex, age, and ethnicity to avoid potential bias and to increase statistical power. Patients with syndromes, psoriasis, and on continuous corticoid use were not included; patients with insufficient material for genetic analysis were excluded from the sample.

Clinical assessment

Clinical characteristics of patients were obtained from questionnaires about their personal, medical and dental history. Clinical and sociodemographic parameters were collected for age, sex, ethnicity, socioeconomic classification, Hamilton's anxiety scale, presence of systemic diseases in individuals or in first-degree relatives, use of medication, history of allergy, smoking, alcoholism, presence of fissured tongue and the index of decayed, missing or filled teeth (DMFT) [18].

The socioeconomic classification of the individuals that constituted the sample was carried out using the ABEP (Brazilian Association of Population Studies - 2008) instrument [19] that allows categorizing patients into socioeconomic groups A1, A2, B1, B2, C, D, and E, through a score assigned to each indicator. The score should range from 0 (class E) to 34 (class A1).

The Hamilton Anxiety scale was used to assess individual anxiety degree [20]. Items were divided into two domains: symptoms of anxious mood and physical symptoms of anxiety, which are measured applying a scale ranging from 0 to 4 (0 = absent; 1 = mild; 2 = medium; 3 = strong; 4 = disabling) to each question of the questionnaire. For each domain, the sum of the items results in a score ranging from 0-28; <17 represents mild severity, 18-24 mild to moderate severity and >25 moderate to severe. Partial scores are then added into a final score ranging from 0 to 56.

DNA collection and purification

Epithelial buccal cells were collected according to described by Trevilatto & Line [21]. In brief, the participants rinsed their mouths with mouthwash 3% glucose solution for 1 minute. DNA was extracted from the obtained suspension of buccal epithelial cells using 10 M ammonium acetate and 1 mM EDTA [22].

Selection of genetic polymorphisms and genotyping

The SNPs were identified from the 1000 Genomes database using the Ferret tool [23] and tag SNPs were selected using Haploview (v. 4.2) in order to cover the entire *TNFAIP3* (geneID 7128) and applying the following criteria: minimum allelic frequency (MAF) of 5% in the caucasian population (CEU), linkage disequilibrium (LD) of $r^2 > 80\%$. Genotyping was performed by TaqMan[®] fluorescence-based allelic discrimination technology as implemented in the 7500 Real-Time PCR platform (Applied Biosystems).

Statistical analysis

All genetic association analysis was performed under additive, dominant and recessive genetic models. Power calculations were performed using the Genetic Power Calculator tool [24]. The range of the sample power is available in table 1.

Continuous variables were described as mean and standard deviation. Categorical variables were expressed by frequencies and percentages. The comparison between groups for categorical variables was performed using Pearson's chi-square test. Association between continuous variables was estimated by the Student's *t*-test for independent samples. For genotypic analysis,

the groups were compared by binary logistic regression, carrying out Bonferroni's correction for multiple testing, that is: the level of significance was adjusted to $p < 0.008$ by dividing 0.05 by 2 informative markers * 3 genetic models tested. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals was estimated. The multivariate analysis was performed adjusting a logistic regression model, including variables with a p -value < 0.20 in the univariate analysis, using the backward method. The final level of statistical significance was $p < 0.05$. The data were analyzed using the IBM SPSS® 20.0. Haploview® 4.2 was used to estimate the Hardy-Weinberg equilibrium and the degree of linkage disequilibrium (LD) between the tag SNPs.

Results

Clinical and sociodemographic analysis

No association was found between BMG and age, sex, ethnicity, socioeconomic status, systemic diseases, systemic diseases in the first-degree relatives, continuous medication, allergies, smoking and alcohol consumption ($p>0.05$). However, higher score for anxiety ($p=0.001$), presence of fissured tongue ($p=3.7*10^{-15}$; OR=107.5; CI: 13.76 - 839.3) and a higher DMFT index ($p=0.002$) were associated with BMG (Table 2).

Genetic univariate analysis

All tag SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group. Two tag SNPs were associated with BMG after Bonferroni's correction ($p<0.008$): rs582757 under the dominant model for allele C ($p=0.007$; OR=2.90; CI: 1.33 - 6.34); and the G allele of rs610604 under the additive ($p=0.006$; OR=4.02; CI:1.49 - 10.83) and the dominant model ($p=0.004$; OR=4.05; CI: 1.55 - 10.55) (Table 3). The two associated markers are in considerable LD (74%; Fig. 1), indicating a good degree of dependence between these polymorphisms in the sample evaluated.

Multivariate analysis

After adjusting the regression model for multiple variables, association was maintained for the following risk factors: presence of fissured tongue ($p=2.4*10^{-5}$; OR=130.11; CI:13.56 - 1248.42), higher anxiety score ($p=0.003$), and rs610604 under the dominant model for the G allele ($p=0.025$; OR 4.58; CI:1.20 - 17.43) (Table 4).

Discussion

BMG is a chronic inflammatory condition, whose etiology is still poorly understood [25]. It affects the dorsum of the tongue, mainly with dekeratinisation, immune cell activity and a consequent loss of filiform papillae of the mucosa [1]. In this study, it was found no association for sex, age, and ethnicity. The association between sex and BMG is yet not well defined, once different authors disagree about the predilection for sex [25–27]. Regarding age, the literature reports that BMG seems to be more common in young adults [8, 25, 28].

In this study, the degree of anxiety was associated with BMG both in the univariate and multivariate analysis, corroborating other studies [29, 30]. Anxiety has been shown to be an important risk factor for BMG [11, 29]. Thus, it is believed that there is a strong interaction between oral health and mental health; people with severe mental illness (including anxiety and depression) have up to 2.7 times the likelihood of losing all their teeth as compared with the general population. It may be due to frequent food intake, bad oral hygiene, use of toxic substances or financial difficulties to access dental care [31]. Also, patients undergoing drug treatment for mental illnesses may experience xerostomia and/or hypo salivation, increasing the chances of developing oral diseases [31]. Indeed, our data reveals that a higher DMFT index was associated with the outcome.

The fissured tongue was a condition strongly associated with BMG, as has been described in previous works [1, 27, 32, 33]; One of the main hypotheses to explain such an association is that the most remarkable finding of the fissured tongue samples is subepithelial infiltrates of leukocytes and lymphocytes causing subepithelial edema. Inflammation that causes edema could explain the increase in the thickness of subepithelial connective tissue, which may induce the breaking of the muscle fibers. Thus, fissured tongue may be a consequence of BMG [34].

A previous Brazilian study estimated that about 36.6% of the BMG variation is explained by genetic factors, thus showing moderate heritability [8]. In this sense, previous case-control studies have analyzed association between BMG and variants of genes *IL1B*, *IL6*, *TNFA* and *IL36RN* related to host inflammatory response [35, 36] and *COMT* and *5HTT*, linked to serotonin transportation and anxiety, respectively [11].

To the authors' knowledge, no studies have investigated association between *TNFAIP3* and BMG. The choice of this candidate gene was based on the fact that Genome-Wide Association Studies – GWAS have consistently indicated this gene locus associated with autoimmune diseases such as psoriasis [37], a condition that shares microscopic similarities with BMG [10].

Association between rs582757 and rs610604 tag SNPs and BMG was found even after Bonferroni's correction, suggesting that these variants may be molecular genetic markers for BMG. In the multivariate regression analysis, the association was maintained for rs610604 – dominant model for allele G. It is noteworthy that the two associated markers are in high LD in the studied Brazilian population (74%), indicating the existence of one single signal of association. Interestingly, rs582757 was the main variant associated in a meta-analysis of the *TNFAIP3* region, unveiling this locus as a risk factor for psoriasis [38]. In the same way, the rs610604 has already been associated with psoriasis [39].

TNFAIP3 is a Tumor Necrosis Factor (TNF) primary response transcript that is an essential negative regulator of inflammation. It acts as a negative-feedback regulator of NF-kappa B activation in response to multiple stimuli, including TNF, Interleukin 1, and Toll-like receptor [12, 40]. *TNFAIP3* deficiency is associated with chronic inflammation and tissue damage in several disease models, including autoimmune diseases as psoriasis [41], lymphoma in primary Sjögren's Syndrome [42], and periodontitis [43]. Psychological anxiety was reported significantly correlated with *TNFAIP3* mRNA expression [44].

This study has the following limitations: the analyses need to be replicated in larger independent population samples to confirm the observed association; also, a study of protein expression would be of great value to understand the role of this protein in the outcome. Finally, the studied tag SNPs were selected based on the CEU population that the authors considered the most similar to the Brazilian population sample used; this creates the possibility of incomplete gene coverage that, due to the positive findings, does not impact upon the reported results and conclusions.

Conclusion

In summary, associations of higher anxiety degree, higher DMFT index and fissured tongue with BMG were found. In addition, our data suggests markers rs582757 and rs610604 of the *TNFAIP3* gene as new molecular risk factors for the disease. Advancing on the understanding of the factors associated with BMG is important both to help in the development of alternative therapeutic approaches to symptomatic cases, as to improve the quality of life of those patients affected. In addition, it can bring new insights of great value to the scientific community, both in the dental and medical context.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest

Thaís Munhoz Pereira declares that she has no conflict of interest.

Rafaela Scariot de Moraes declares that she has no conflict of interest.

Laís Cristina Giacobbo declares that she has no conflict of interest.

Laysa Toschi Martins declares that she has no conflict of interest.

Marcelo Távora Mira declares that he has no conflict of interest.

Paula Cristina Trevilatto declares that she has no conflict of interest.

Funding

The work was supported by a Grant from Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, CAPES Scholarship and CNPq grant.

Ethical approval

All procedures performed in study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Mangold AR, Torgerson RR, Rogers RS (2016) Diseases of the tongue. *Clin Dermatol* 34:458–469. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.018>
2. Villanueva-Vilchis M-C, López-Ríos P, García I-M, Gaitán-Cepeda L-A (2016) Impact of oral mucosa lesions on the quality of life related to oral health. An etiopathogenic study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 21:e178-84. <https://doi.org/10.4317/MEDORAL.20866>
3. Shulman JD, Carpenter WM (2006) Prevalence and risk factors associated with geographic tongue among US adults. *Oral Dis* 12:381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01208.x>
4. Miloğlu Ö, Göregen M, Akgül HM, Acemoğlu H (2009) The prevalence and risk factors associated with benign migratory glossitis lesions in 7619 Turkish dental outpatients. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 107:e29–e33. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.10.015>
5. Koay CL, Lim JA, Siar CH (2011) The prevalence of tongue lesions in Malaysian dental outpatients from the Klang Valley area. *Oral Dis* 17:210–216. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01724.x>
6. Rezaei F, Safarzadeh M, Mozafari H, Tavakoli P (2015) Prevalence of Geographic tongue and Related Predisposing Factors in 7-18 Year-Old Students in Kermanshah, Iran 2014. *Glob J Health Sci* 7:91–95. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n5p91>
7. Tortorici S, Corrao S, Natoli G, Difalco P (2016) Prevalence and distribution of oral mucosal non-malignant lesions in the western Sicilian population. *Minerva Stomatol* 65:191–206
8. Jorge MA, Gonzaga HF de S, Tomimori J, et al (2017) Prevalence and heritability of psoriasis and benign migratory glossitis in one brazilian population. *An Bras Dermatol* 92:816–819. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20176389>
9. Huamei Y, Yu Z, Xin Z, et al (2015) [Research progress on the risk factors of geographic tongue]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 33:93–7
10. Picciani BLS, Domingos TA, Teixeira-Souza T, et al (2016) Geographic tongue and psoriasis: Clinical, histopathological, immunohistochemical and genetic correlation –a literature review. *An Bras Dermatol* 91:410–421. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164288>

11. Scariot R, Sebastiani AM, Meger MN, et al (2019) Anxiety and genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and serotonin transportation gene (5HTT) are associated with benign migratory glossitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 127:218–224. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.10.011>
12. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, et al (2010) Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochem Pharmacol* 80:2009–2020
13. Wartz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature* 430:694–699. <https://doi.org/10.1038/nature02794>
14. Han JW, Wang Y, Li HB, et al (2016) Single nucleotide polymorphisms of TNFAIP3 are associated with systemic lupus erythematosus in Han Chinese population. *Int J Immunogenet* 43:96–100. <https://doi.org/10.1111/iji.12250>
15. Hao G, Li Y, Liu J, Wo M (2014) TNFAIP3 rs2230926 polymorphisms in rheumatoid arthritis of southern Chinese Han population: a case-control study. *Int J Clin Exp Pathol* 7:8958–61
16. Nezos A, Gkioka E, Koutsilieris M, et al (2018) TNFAIP3 F127C coding variation in Greek primary sjogren's syndrome patients. *J Immunol Res* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6923213>
17. Indhumathi S, Rajappa M, Chandrashekar L, et al (2015) TNFAIP3 and TNIP1 polymorphisms confer psoriasis risk in South Indian Tamils. *Br J Biomed Sci* 72:168–173. <https://doi.org/10.1080/09674845.2015.11665748>
18. Klein H, Palmer CE (1937) Dental caries in American indian children. *Public Health Bulletin*, 239:1-54
19. ABEP (2008) Critério de classificação econômica Brasil (CCEB). Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP). <http://www.abep.org/criterio-brasil>. Accessed on May 20, 2020
20. Hamilton M (1959) The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol* 32:50–5
21. Trevilatto PC, Line SR (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 18:6–9
22. Aidar M, Line SR (2007) A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 18: 148–152.

23. Limou S, Taverner AM, Winkler CA (2016) Ferret: a user-friendly Java tool to extract data from the 1000 Genomes Project. *Bioinformatics* 32:2224–2226. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw147>
24. Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19:149–50
25. Shareef S, Etefagh L (2020) Geographic Tongue. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554466/>. Accessed on May 20, 2020
26. Germi L, de Giorgi V, Bergamo F, et al (2012) Psoriasis and oral lesions: Multicentric study of oral mucosa diseases italian group (GIPMO). *Dermatol Online J* 18
27. Netto J de NS, Dias M de C, Garcia TRU, et al (2019) Geographic stomatitis: An enigmatic condition with multiple clinical presentations. *J Clin Exp Dent* 11:e845–e849. <https://doi.org/10.4317/jced.55758>
28. Oyetola EO, Oluwande A, Agho ET (2018) Geographic Tongue: Pattern of presentation in a South Western nigerian teaching hospital. *Ann Ibadan Postgrad Med* 16:131–135
29. Alikhani M, Khalighinejad N, Ghalaiani P, et al (2014) Immunologic and psychologic parameters associated with geographic tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 118:68–71. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.03.007>
30. González-Álvarez L, García-Pola MJ, Garcia-Martin JM (2018) Geographic tongue: Predisposing factors, diagnosis and treatment. A systematic review. *Rev Clin Esp* 218:481–488
31. Kisely S (2016) No mental health without oral health. *Can J Psychiatry* 61:277–282
32. Scariot R, Batista TBD, Olandoski M, et al (2017) Host and clinical aspects in patients with benign migratory glossitis. *Arch Oral Biol* 73:259–268. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.027>
33. Picciani B, Santos V de C, Teixeira-Souza T, et al (2017) Investigation of the clinical features of geographic tongue: unveiling its relationship with oral psoriasis. *Int J Dermatol* 56:421–427. <https://doi.org/10.1111/ijd.13460>
34. Järvinen J, Mikkonen JJW, Kullaa AM (2014) Fissured tongue: A sign of tongue edema? *Med Hypotheses* 82:709–712. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.03.010>
35. Guimarães ALS, Correia-Silva JDF, Diniz MG, et al (2007) Investigation of

functional gene polymorphisms: IL-1B, IL-6 and TNFA in benign migratory glossitis in Brazilian individuals. *J Oral Pathol Med* 36:533–537. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00559.x>

36. Liang J, Huang P, Li H, et al (2017) Mutations in IL36RN are associated with geographic tongue. *Hum Genet* 136:241–252. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1750-y>
37. Nair RP, Duffin KC, Helms C, et al (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* 41:199–204. <https://doi.org/10.1038/ng.311>
38. Nititham J, Taylor KE, Gupta R, et al (2015) Meta-analysis of the TNFAIP3 region in psoriasis reveals a risk haplotype that is distinct from other autoimmune diseases. *Genes Immun* 16:120–126. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.75>
39. Zhang C, Zhu KJ, Liu H, et al (2015) The TNFAIP3 polymorphism rs610604 both associates with the risk of psoriasis vulgaris and affects the clinical severity. *Clin Exp Dermatol* 40:426–430. <https://doi.org/10.1111/ced.12536>
40. Vereecke L, Beyaert R, Van Loo G (2011) Genetic relationships between A20/TNFAIP3, chronic inflammation and autoimmune disease. In: *Biochemical Society Transactions*. pp 1086–1091
41. Aki A, Nagasaki M, Malynn BA, et al (2017) Hypomorphic A20 expression confers susceptibility to psoriasis. *PLoS One* 12:6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180481>
42. Johnsen SJA, Gudlaugsson E, Skaland I, et al (2016) Low Protein A20 in Minor Salivary Glands is Associated with Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. *Scand J Immunol* 83:181–187. <https://doi.org/10.1111/sji.12405>
43. Li Y, Mooney EC, Holden SE, et al (2019) A20 Orchestrates Inflammatory Response in the Oral Mucosa through Restraining NF-κB Activity. *J Immunol* 202:2044–2056. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801286>
44. Chen RA, Huang TL, Huang KW, Hung YY (2018) TNFAIP3 mRNA Level Is Associated with Psychological Anxiety in Major Depressive Disorder. *Neuroimmunomodulation* 24:271–275. <https://doi.org/10.1159/000486860>

Tables

Table 1 Calculation of the sample power, using the Genetic Power Calculator tool [24], setting as parameters: $D'= 1$, rare allele frequency ranging from 26.4% to 31.8% (based on the minimum allele frequency of the informative markers – rs582757 and rs610604, respectively), prevalence of BMG 7% and level of significance of 0.05, with the power variation being dependent on the relative risk of rare allele.

Effect size	rs582757		rs610604	
	Power	n cases for 80% power	Power	n cases for 80% power
1.5	0.122	556	0.105	730
2	0.257	202	0.210	260
3	0.563	76	0.466	98
4	0.777	46	0.675	59
5	0.890	33	0.808	43

Table 2 Results of univariate analysis for clinical and sociodemographic variables (case group n=44; control group n=130)

Variable	Groups		p- value	OR (CI 95%)
	Case	Control		
Age ^a	33.7 (12.5)	32.8 (12)	0.694	—
Sex ^b				
Male	19 (43.2)	58 (44.6)	0.869	0.94 (0. 47 - 1.88)
Female	25 (56.8)	72 (55.4)		
Ethnicity ^b				
Caucasian	38 (86.4)	114 (87.7)	0.819	1.12 (0.41 - 3.08)
Non-Caucasian	6 (13.6)	16 (12.3)		
Socioeconomic status ^b				
A1/A2/B1/B2	9 (20.5)	35 (26.9)	0.394	1.43 (0.62 - 3.28)
C1/C2/D/E	35 (79.5)	95 (73.1)		
Anxiety scale ^a	13.9 (8.6)	9.0 (6.1)	0.001	—
Systemic disease ^b				
No	21 (47.7)	69 (53.1)	0.539	1.23 (0.62 - 2.45)
Yes	23 (52.3)	61 (46.9)		
Systemic disease - first-degree relatives ^b				
No	8 (18.2)	33 (25.4)	0.331	1.53 (0.64 - 3.62)
Yes	36 (81.8)	97 (74.6)		

Continuous medication ^b				
No	19 (43.2)	65 (50)	0.434	1.31 (0.66 - 2.61)
Yes	25 (56.8)	65 (50)		
Allergies ^b				
No	32 (72.7)	95 (73.1)	0.964	1.01 (0.47 - 2.19)
Yes	12 (27.3)	35 (26.9)		
Smoking ^b				
No	39 (88.6)	122 (93.8)	0.256	1.95 (0.60 - 6.32)
Yes	5 (11.4)	8 (6.2)		
Alcohol consumption ^b				
No	24 (54.5)	66 (50.8)	0.665	0.85 (0.43 - 1.70)
Yes/Socially	20 (45.5)	64 (49.2)		
Fissured tongue ^b				
No	24 (54.5)	129 (99.2)	3.7*10⁻¹⁵	107.5
Yes	20 (45.5)	1 (0.8)		(13.76 - 839.3)
DMFT index ^a				
	11.9 (7.4)	7.9 (6.8)	0.002	—

^a Mean (Standard Deviation) - comparison between groups performed by Student's t test for independent samples

^b n (%) - comparison between groups using Pearson's chi-square test

Table 3 Results of genetic univariate analysis (case group n=44; control group n=130)

dbSNP ^a	Genetic Model	Genotype	Groups - n (%)		p-value ^b	OR (CI 95%)
			Case	Control		
rs582757	Additive	TT	11 (27.5)	64 (52.5)	0.027	—
		CT	26 (65)	52 (42.6)	0.008	2.90 (1.31 - 6.43)
		CC	3 (7.5)	6 (4.9)	0.170	2.90 (0.63 - 13.38)
	Dominant T	TT + CT	37 (92.5)	116 (95.1)	0.539	1.56 (0.37 - 6.58)
		CC	3 (7.5)	6 (4.9)		
	Recessive T	CC + CT	29 (72.5)	58 (47.5)	0.007	2.90 (1.33 - 6.34)
	TT	11 (27.5)	64 (52.5)			
rs610604	Additive	GG	6 (18.8)	14 (11.7)	0.029	4.14 (1.16 - 14.80)
		GT	20 (62.5)	48 (40)	0.006	4.02 (1.49 - 10.83)
		TT	6 (18.8)	58 (48.3)	0.016	—
	Dominant G	GG + GT	26 (81.3)	62 (51.7)	0.004	4.05 (1.55 - 10.55)
		TT	6 (18.8)	58 (48.3)		
	Recessive G	TT + GT	26 (81.3)	106 (88.3)	0.297	1.74 (0.61 - 4.98)
	GG	6 (18.8)	14 (11.7)			
rs5029930	Additive	AA	33 (89.2)	102 (83.6)		
		AC	4 (10.8)	20 (16.4)	0.410	1.61 (0.51 - 5.07)
		CC	0	0		

rs5029933	Dominant A	AA + AC CC	37 (100) 0	122 (100) 0	—	—
	Recessive A	CC + AC AA	4 (10.8) 33 (89.2)	20 (16.4) 102 (83.6)	0.410	1.61 (0.51 - 5.07)
	Additive	AA	41 (95.3)	118 (92.9)	0.578	1.56 (0.32 - 7.53)
		AG	2 (4.7)	9 (7.1)		
		GG	0	0		
	Dominant A	AA + AG GG	43 (100) 0	127 (100) 0	—	—
Recessive A	GG + AG AA	2 (4.7) 41 (95.3)	9 (7.1) 118 (92.9)	0.578	0.64 (0.13 -3.08)	

^a SNP identifier based on the NCBI SNP database

^b Binary logistic regression

The different n values refer to failure in genotyping

The rs5029930 and rs5029933 were not considered in Bonferroni's correction because they presented low frequency of the rare allele in the sample. Therefore, they were considered non-informative.

Table 4 Results of multivariate analysis (case group n=44; control group n=130)

Variable	Groups		p- value	OR (CI 95%)
	Case	Control		
Fissured tongue ^a				
No	24 (54.5)	129 (99.2)	2.4*10⁻⁵	130.11 (13.56 - 1248.42)
Yes	20 (45.5)	1 (0.8)		
Anxiety Scale ^b	13.9 (8.6)	9.0 (6.1)	0.003	—
rs610604 ^a				
GG + GT	26 (81.3)	62 (51.7)	0.025	4.58 (1.20 - 17.43)
TT	6 (18.8)	58 (48.3)		

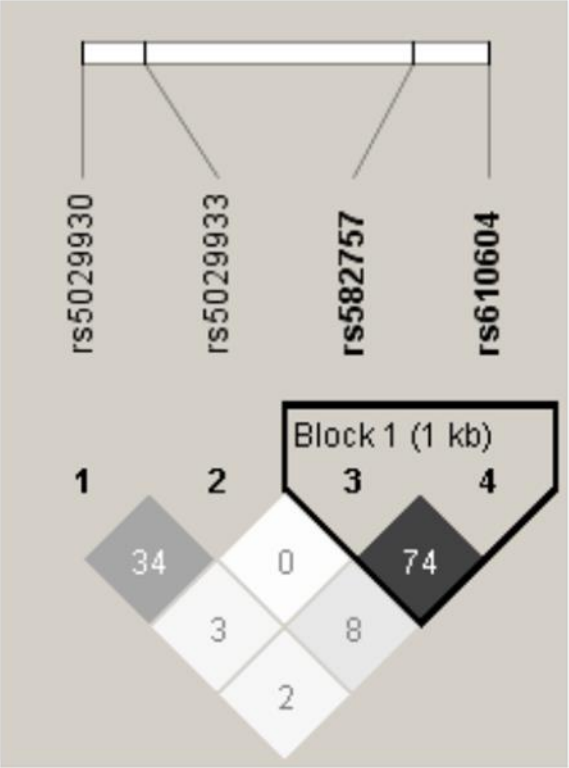
^a n (%)

^b Mean (Standard Deviation)

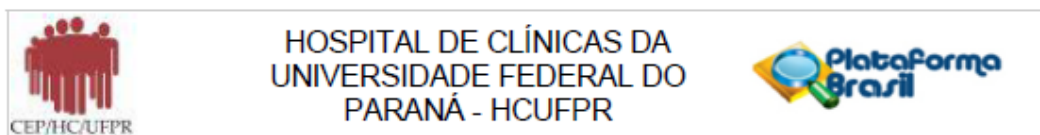
The rs610604 (dominant model for the G allele) presented different n value due to failure in genotyping

Figure

Fig. 1 Analysis of linkage disequilibrium (LD) between tagSNPS of the *TNFAIP3* gene for the studied population. The number inside the squares indicates the proportion of LD in %. The intensity of the square color reflects the degree of LD between two loci (darker squares represent a higher LD between two SNPs).



Parecer de comitê de ética



PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE CLÍNICA, CITOLÓGICA E GENÉTICA EM PORTADORES DE GLOSSITE MIGRATÓRIA BENIGNA E DE LÍQUEN PLANO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01328412.5.0000.0020

Pesquisador: Paula Cristina Trevilatto

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 105.800

Data da Relatoria: 24/08/2012

Apresentação do Projeto:

Pesquisa apresentada pela Dra. Paula Cristina Trevilatto, professora titular da PUC do Paraná que, segundo se depreende, fará parte de uma pesquisa para obtenção de grau de doutorado (no cronograma há referência a defesa de tese). O objetivo da pesquisa é estudar duas moléstias relativamente benignas: 1- a estomatite geográfica, caracterizada pela perda das papilas filiformes do dorso da língua e pelo surgimento de um edema inflamatório associado, e 2- o líquen plano, enfermidade sistêmica que pode acometer pele e mucosa bucal caracterizada por reação inflamatória crônica, mucocutânea e de fundo imunológico

Objetivo da Pesquisa:

Investigar eventuais associações comuns entre o processo inflamatório e as alterações citológicas e genéticas encontradas em pacientes portadores de glossite migratória benigna e de líquen plano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos associados à coleta de material não são maiores do que uma rotina de escovação normal da boca podendo trazer no máximo algum desconforto, colocado no TCLE. Os benefícios são de longo prazo, na forma de uma melhor compreensão das duas moléstias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente e bem desenhada não cabendo qualquer reparo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto de acordo. A ficha de anamnese é bastante completa e bem estruturada.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Camero, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas, projeto poderá ser considerado aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

CURITIBA, 25 de Setembro de 2012

Assinado por:
Renato Tambara Filho

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

_____ (nome completo), nacionalidade: _____, idade: _____, estado civil: _____, profissão: _____
_____ endereço: _____
_____, RG: _____

_____ estou sendo convidado (a) a participar de um estudo denominado **Análise clínica, citológica e genética em portadores de glossite migratória benigna e de líquen plano**, cujo objetivo é descobrir se ocorrem modificações nas células da boca em função da língua geográfica ou do líquen plano. Além disso, descobrir se a causa desta doença está associada aos genes que participam da resposta imunológica e inflamatória do paciente.

A minha participação no estudo será através de um exame visual da minha boca e, em seguida, a realização de um exame de citologia esfoliativa, que consiste na passagem suavemente de uma escova de cerdas de nylon macia em movimentos giratórios (cinco voltas) na língua e na bochecha.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, pois é por meio das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a realização da pesquisa. Assim, como em qualquer tratamento, eu poderei experimentar algum desconforto. No entanto, a citologia esfoliativa não oferecerá qualquer tipo de dor ao participante.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar. Caso deseje sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

A pesquisadora envolvida com o referido projeto é a Profa. Dra. Paula Cristina Trevillato, professora da PUC/PR, (formas de contato: 3271-2618, e-mail: pctrev@yahoo.com.br) que poderá ser contatada (Rua Imaculada Conceição, 1155 Curitiba - PR 80215-901 – Brasil) a qualquer momento.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um *email* para cep@pucpr.br

Curitiba, ... de ... de 201...

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

Prof. Dr. Paula Cristina Trevillato
Pesquisadora responsável pelo projeto

Normas para publicação - Clinical Oral Investigations

As normas para publicação na revista Clinical Oral Investigations podem ser obtidas através do link abaixo:

<https://www.springer.com/journal/784/submission-guidelines>

Produção científica

Durante a minha formação acadêmica tive oportunidade de participar de vários projetos de pesquisa, nos quais acabei contribuindo e participando como co-autora de alguns artigos científicos, a se conhecer:

Artigo 1

Título: A Complete Physical Mapping of the Vitamin D Receptor Gene for Dental Implant Loss: A Pilot Study

Autores: Thaís Munhoz Pereira, Fabiano Alvim-Pereira, Claudia Cristina Kaiser Alvim-Pereira, Sérgio Aparecido Ignácio, Cleber Machado de Souza, Paula Cristina Trevilatto

Ano de publicação: 2019

Revista: *Clinical Oral Implants Research*

Classificação Qualis: A1

Classificação Scimago: Q1

Fator de Impacto: 3,72

Contribuições: Este projeto foi desenvolvido ao longo do meu mestrado (dissertação).

Abstract

Objectives: The aim of this pilot case-control study was to investigate the association of clinical variables and genetic polymorphisms in the vitamin D receptor gene (VDR) with dental implant loss.

Material and methods: This study was carried out with 244 individuals with mean age 51.90 ± 11.28 (81 cases and 163 controls matched by age, sex, and smoking habit). Also, the clusterization phenomenon was investigated stratifying the sample into two groups: (a) 34 patients with multiple losses (presenting two or more lost implants) and (b) 210 without multiple losses (up to one implant loss). Sociodemographic, clinical, and periodontal parameters were analyzed. The tagSNPs in the VDR gene were analyzed by real-time PCR. Univariate and multivariate analyses were performed ($p < .05$).

Results: Edentulism, number of implants installed, and Gingival, Plaque, and Calculus Indexes were associated with implant loss in the univariate analysis. After the multivariate analysis, the allele G of rs3782905 in the recessive model, together with number of installed implants and Gingival Index, was associated with implant failure.

Conclusion: It is suggested that the allele G of rs3782905 in the recessive model may be a new genetic risk marker for dental implant loss in patients who lost two or more dental implants. In addition, number of implants installed and Gingival Index were also associated. Replication is mandatory to confirm these findings, due to the modest sample size of this work.

Keywords: VDR; clinical parameters; dental implant loss; genetic polymorphisms.

Artigo 2

Título: RANK/RANKL/OPG Gene Polymorphisms and Loss of Orthodontic Mini-Implants - 2020

Autores: Laís Cristina Giacobbo, Maria Augusta Andriago Perin, Thaís Munhoz Pereira, Mariana Oliveira Garmendia, Alexandre Reichow, Ana Cláudia Melo, Bruno Borges de Castilhos, Paula Cristina Trevilatto

Ano de publicação: 2020

Revista: *Orthodontics and Craniofacial Research*

Classificação Qualis: A1

Classificação Scimago: Q2

Fator de Impacto: 1,45

Contribuições: Este projeto foi desenvolvido ao longo do mestrado das colegas Laís Cristina Giacobbo e Maria Augusta Andriago Perin juntamente com o trabalho de pós-doutorado do Bruno Borges Castilhos. Contribuí com a análise estatística e escrita do *paper*.

Abstract

Objective: To investigate the association of genetic polymorphisms (tagSNPs type) of RANK/RANKL/OPG genes with the loss of orthodontic mini-implants (MIs).

Setting and sample population: One hundred and thirty-five patients of both sexes, with mean age of 48.7 ± 10 (20-76 years), were studied. The control group was composed of 104 patients, with no MI lost and functioning for at least 6 months and the case group, of 31 patients with at least one MI lost.

Materials and methods: Cells were obtained by mouthwash with 3% glucose solution for 1 minute and scraping the buccal mucosa with sterilized spatula. DNA was extracted from buccal epithelial cells with 10 M ammonium acetate and 1 mM EDTA. Genotyping was performed by the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. Univariate and multivariate analyses were performed ($P < .05$).

Results: No markers were associated with MI loss after Benjamini and Hochberg false discovery rate correction of Univariate tests. In the multivariate analysis, the variables that associated with MI loss were the number of MIs installed ($P < .000$) and the polymorphism rs8086340 in the RANK gene ($P = .018$).

Conclusion: A higher number of MIs installed ($P < .000$) and polymorphism rs8086340 in the RANK gene ($P = .018$) were associated with loss of orthodontic MIs after multivariate analysis.

Keywords: OPG; RANK; RANKL; genetic polymorphisms; mini-implant.

Artigo 3

Título: Analysis between the demographic, clinical variables and *IL6* gene polymorphisms and the external apical root resorption

Autores: Isabela Almeida Shimizu, Cleber Machado de Souza, Roberto Hideo Shimizu, Thaís Munhoz Pereira, Dieila Giomo de Lima, Paula Cristina Trevilatto

Status: Foi submetido na revista *The Angle Orthodontist* (Q1/A2 – fator de impacto 1,88), porém foi negado. Neste momento estamos estudando as opções de revista para envio.

Contribuições: Neste artigo contribui com a etapa laboratorial (extração de DNA) e com a escrita do trabalho, ainda quando estava na graduação, como aluna de iniciação científica.

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the association between demographic and clinical variables and the *IL6* gene polymorphisms and EARR (external apical root resorption) in orthodontic patients.

Method: The sample was composed of 301 patients (control group: n=148 EARR<1.40 mm; study group: n=153 RRAE \geq 1.40 mm), unrelated, both sexes, mean age 14.8 (8 to 21) years, who presented Class II, division 1 malocclusion. Periapical x-rays of the upper central incisor with the longer root (reference tooth) were taken pre-treatment and six months after the beginning of the treatment. DNA was extracted from epithelial bucal cells and the *IL6* gene polymorphisms analysis was undertaken by real time PCR. To investigate the association between demographic, clinical and genetic variables and EARR, uni and multivariate analyses were done ($p<0.05$).

Results: In relation to clinical variables, EARR was positively associated with initial longest root ($p=0.019$). Considering the *IL6* gene polymorphisms, four signals of association were found (rs1524107, $p=0.048$; rs2069840, $p=0.000$; rs2069843, $p=0.012$; rs2069845, $p=0.000$) and two of them remained associated after the multivariate analysis (rs206984 Dom G, $p=0.000$; rs2069845 Dom G, $p=0.013$).

Conclusion: There was no association between the demographic variables and EARR; the initial root length was associated with EARR, indicating major susceptibility in the longest roots. Four polymorphisms were associated to EARR, indicating that *IL6* gene is a relevant candidate gene in the study of this complex situation. Moreover, for the first time, it was done a complete physical mapping of *IL6* gene (tag SNPs) in patients with EARR.

Key-words: Orthodontics; root resorption, tooth movement, interleukin-6.

Artigo 4

Título: Complete physical mapping of the *TNF* cluster suggests a new genetic risk factor for chronic periodontitis

Autores: Kelli Freitas Marzani, Thaís Munhoz Pereira, Valeria Kruchelski Huk de Andrade, Cleber Machado de Souza, Paula Cristina Trevilatto

Status: Foi submetido na revista *Brazilian Oral Research* (Q1/A2 – fator de impacto 1,22), porém foi negado. Neste momento estamos estudando as opções de revista para envio.

Contribuições: Neste trabalho contribui com a análise estatística e escrita do *paper*.

Abstract: The aim of this paper was to investigate the association of sociodemographic parameters, oral covariates, and polymorphisms in the *LTA*, *LTB* and *TNFA* genes with chronic periodontitis (CP) in a Brazilian population, through a complete physical mapping of the candidate genes. In this pilot case-control study consisted of 120 individuals, 58 with CP and 62 healthy controls, with a mean age of 39.9 ± 9.5 years, genetic polymorphisms, sociodemographic parameters, and oral covariates were analyzed. For genetic analysis, DNA was extracted from cells of the buccal epithelium. The polymorphisms were analyzed by real-time PCR (TaqMan® Genotyping Master Mix technology). Univariate and multivariate analyses were performed ($p < 0.05$). A higher probing pocket depth, clinical attachment loss, plaque index and the number of decayed, missing and filled teeth (DMF-T) were associated with CP in the univariate analysis. After Bonferroni correction, no markers were associated with CP. In the multivariate model, a higher DMF-T index was associated together with the rs2071590 of the *LTA* gene in the additive model. We suggest that the *LTA* gene (rs2071590 - CC genotype in the additive model) may be a risk factor for CP. Replications are crucial to confirm these findings.

Keywords: *TNF* cluster; genetic polymorphisms; chronic periodontitis; case-control study

Artigo 5

Título: Oral mycological features of infants with cleft palate

Autores: Patrícia Tolentino da Rosa de Souza, Nilza Cristina Lopes Afonso de Valor Gonçalves Wilhelmsen, Rosimeire Takaki Rosa, Thais Munhoz Pereira, Aldini Beuting Pereira Kitahara, Sérgio Aparecido Ignácio, Luciana Reis Azevedo-Alanis, Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa

Status: Foi submetido na revista *Oral Diseases* (Q1/A1 – fator de impacto 2,61) e *Archives of Oral Biology* (Q1/A2 - fator de impacto 1,93), porém foi negado. Neste momento estamos estudando as opções de revista para envio.

Contribuições: Contribui com a análise dos dados e escrita do trabalho durante a disciplina de Literatura Científica Avançada, ofertada aos alunos do PPGO.

Abstract

Objective To study the oral colonization and to evaluate the virulence factors of *Candida* spp. in patients aged from 0-18 months with cleft palate.

Materials and Methods The study included 60 infants divided into three groups: cleft palate (CP); cleft palate with orthodontic plate (CPwP); control group (Ctrl) without cleft palate. Information on feeding habits, hygiene and past history of candidiasis were collected from the patients included in the study. The presence of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. dubliniensis* were investigated in samples of saliva collected from the patients. Hydrophobicity, protease, esterase, phospholipase and hemolysin were evaluated.

Results The colonization by *Candida* spp. in CP, CPwP and Ctrl was 89.5%, 100% and 44%, respectively. Candidosis was more reported in the cleft groups than in the control group ($p \leq 0.023$). There was a high prevalence of *C. albicans*, followed by *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* in the three groups. There was no uniformity of expression in the virulence factors, either between the different species or between the different groups of patients.

Conclusion Colonization by *Candida* spp. occurred in the three groups of patients, being superior in the CPwP group. *Candida albicans* was the predominant species and virulence factors did not exhibit a characteristic pattern for species or groups of patients

Artigo 6

Título: The rs2069843 polymorphism of the *IL6* gene plays an important role in tooth replantation

Autores: Liliane Roskamp, Paula Cristina Trevilatto, Cleber Machado de Souza, Dieila Giomo de Lima, Thaís Munhoz Pereira, Sérgio Aparecido Ignácio, Vânia Portela Ditzel Westphalen

Status: Foi submetido na revista *Australian Endodontic Journal* (Q1/B2 - fator de impacto 1,12) em julho de 2020. Estamos aguardando o retorno do periódico.

Contribuições: Contribuí com a parte laboratorial (extração de DNA e genotipagem) ainda enquanto aluna de iniciação científica.

Abstract

The absence or presence of root resorption on the root surface of a replanted tooth indicates an immune-inflammatory reaction. Since Interleukin 6 (IL-6) is considered an inflammatory marker, this study aimed to investigate the association of clinical variables and polymorphisms in *IL6*, with the outcome of replanted teeth in 1-year of follow-up. One hundred and twenty-seven avulsed teeth that were replanted and had their root canals treated were selected for this study. Periapical radiographs were taken after replantation and after 1 year. Real Time-PCR was used to genotype *IL6* polymorphisms. Chi-square and “Z” tests were performed to verify the association of genetic variables and the prognosis of replanted teeth ($P < .05$). An association was observed with the rs2069843 polymorphism of *IL6* to the outcome of replanted teeth ($P < .05$). The rs2069843 of *IL6* may influence the outcome of avulsed and replanted teeth, in the first year post-trauma.

Keywords: cytokines, genetics, polymorphisms, root resorption, tooth replantation.

Trajetória acadêmica e atividades complementares

Minha história acadêmica começou em 2012, quando iniciei a graduação em Odontologia na PUCPR. Logo no primeiro período da faculdade, conheci a professora Paula Cristina Trevilatto, que ministrava as disciplinas de Histologia e Genética para o curso de Odontologia.

Sempre gostei muito das disciplinas básicas, pois adorava compreender como as situações clínicas poderiam ser compreendidas pelos aspectos microscópicos e moleculares. Percebendo essa curiosidade, logo no final do primeiro período, a professora Paula me convidou para fazer iniciação científica (IC) com seu grupo de pesquisa. Isso foi uma grande alegria!

Concluído o primeiro ano de Iniciação Científica, surgiu outro desafio: apresentar os resultados da pesquisa no Seminário de Iniciação Científica (SEMIC) da PUCPR. Obtendo bom desempenho, continuei com a professora Paula por mais 2 anos até que ela me fez uma outra grande proposta: concorrer a uma bolsa de mestrado na modalidade PIBIC Master. Encarei o desafio e juntas conseguimos a aprovação. No ano de 2016, último ano da faculdade, iniciei o mestrado em paralelo com a graduação. Confesso que não foi fácil conciliar todas estas atividades, mas com a ajuda de pessoas especiais (família, amigos e professores) tudo deu certo e consegui concluir o curso de Odontologia com êxito, sendo agraciada com o Prêmio Marcelino Champagnat.

Após esta etapa, outras oportunidades maravilhosas me foram concedidas pela PUCPR: continuar com a Pós-Graduação *stricto sensu* (doutorado) e me aprimorar ainda mais através do curso de especialização em Ortodontia. Esta foi uma conquista que fez meu coração transbordar de alegria. Sou muito grata ao professor Orlando Motohiro Tanaka por ter me aceitado na pós-graduação *lato sensu*, mesmo havendo outros fortes candidatos concorrendo à bolsa do curso, uma vez que estes também receberam o reconhecimento de Mérito Acadêmico.

Durante todo esse trajeto, da graduação a pós-graduação, outros eventos complementares foram importantes para a minha formação. Entre os principais destacam-se a participação nas reuniões da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, nas quais apresentei trabalhos em diversas modalidades. No ano de 2017 fomos aprovados para apresentação no fórum científico. Em 2018, na modalidade painel aspirante, fomos agraciados com a premiação de 1º lugar com

o trabalho intitulado “Fatores clínicos, periodontais e genéticos associados com a perda de implantes dentais e o fenômeno de clusterização”. Tive um contato muito prazeroso com o grupo da Saúde Coletiva do PPGO, participando do estudo de COORTE materno-infantil de Curitiba no ano de 2018, supervisionando e coletando dados para o projeto na Unidade de Saúde Mãe Curitibana. No ano de 2019 participei da 36ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e do XIV Congresso Internacional de Odontologia do Paraná.

Também participei de diversos eventos da PUCPR durante os SEMICs, inclusive como palestrante e debatedora (no caso de workshops). A PUCPR ainda me oportunizou realizar diversos cursos no Create e também pude desenvolver uma oficina de Bioestatística para os alunos do PPGO, intitulada “Tabulação de dados em pesquisa quantitativa: do Excel ao SPSS”. Este curso foi ministrado por mim juntamente com outros colegas do Doutorado (a Laís Cristina Giacobbo e o Thiago Meira, ambos estudantes da Ortodontia também).

Hoje sinto-me muito realizada por ter feito pós-graduação *stricto sensu*, pois esta me permitiu ter outra visão de mundo, independentemente do assunto que esteja sendo debatido. Desenvolvi a capacidade de avaliar os diversos fenômenos da vida, quer eles sejam biológicos, sociais, comportamentais, políticos ou outros de maneira diferente. Sonho em atuar profissionalmente como cirurgiã dentista/ortodontista e pesquisadora, produzindo pesquisa de qualidade, contribuindo para a melhora da vida das pessoas e gerando conhecimento que possa ser útil para a resolução dos problemas complexos que a sociedade apresenta.

Para maiores informações: <http://lattes.cnpq.br/7573917375617330>