



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – ENDODONTIA**

**LILIANE ROSKAMP**

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES  
*IL4* E *IL6* NA EVOLUÇÃO DO DENTE AVULSIONADO APÓS 1 ANO DE  
REIMPLANTE**

**CURITIBA**  
**2015**

**LILIANE ROSKAMP**

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES  
*IL4* E *IL6* NA EVOLUÇÃO DO DENTE AVULSIONADO APÓS 1 ANO DE  
REIMPLANTE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Área de concentração em Endodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Endodontia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Vânia Portela Ditzel Westphalen  
Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto**

**CURITIBA**

**2015**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

R821a 2015	<p>Roskamp, Liliane</p> <p>Avaliação dos aspectos clínicos e polimorfismos nos genes <i>IL4</i> e <i>IL6</i> na evolução do dente avulsionado após 1 ano de reimplante / Liliane Roskamp ; orientadora, Vânia Portela Ditzel Westphalen ; co-orientadora, Paula Cristina Tervilatto. – 2015 96 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2015. Inclui bibliografias Texto em português e inglês</p> <p>1. Polimorfismo (Genética). 2. Reabsorção da raiz (Dentes). 3. Reimplante dentário. 4. Odontologia. I. Westphalen, Vânia Portela Ditzel. II. Tervilatto, Paula Cristina. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação Odontologia. IV. Título.</p> <p>CDD 22. ed. – 617.6</p>
---------------	---



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola Saúde e Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

**PUCPR**  
GRUPO MARISTA

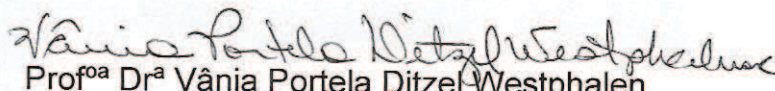
## TERMO DE APROVAÇÃO


**LILIANE ROSKAMP**

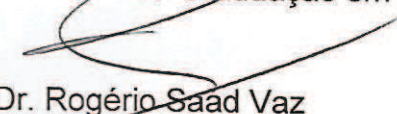
### **AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES IL4 E IL6 NA EVOLUÇÃO DO DENTE AVULSIONADO APÓS 1 ANO DE REIMPLANTE**

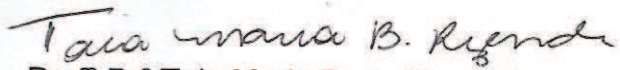
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Endodontia**.

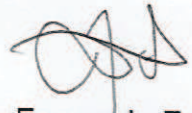
Orientador (a):

  
Prof<sup>oa</sup> Dr<sup>a</sup> Vânia Portela Ditzel Westphalen  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Cristina Trevilatto  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Rogério Saad Vaz  
Programa de Pós-Graduação em Ensino nas Ciências da Saúde, FPP

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Taia Maria Berto Rezende  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia,  
UCB

  
Prof. Dr. Luiz Fernando Fariniuk  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 10 de dezembro de 2015.

Aos meus filhos, Marco, André e Isabela Roskamp Sunye, por ofertarem a felicidade e alegria que me energiza todos os dias. Ao meu marido, Jaime Sunye Neto, pelo respeito aos meus anseios. Aos meus pais, Lizette Cunico Roskamp e Manoel Henrique Roskamp, por serem meus eternos exemplos de amor, força e perseverança.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha família, pelo amor e apoio incondicional, cada um do seu próprio jeitinho.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pela recepção, pela concessão da bolsa de estudos e a oportunidade de desenvolvimento científico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de concentração em Endodontia e seu diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sergio Vieira, por sempre incentivar o melhor ao programa.

À Profa. Dra. Vânia Portela Ditzel Westphalen por ter acreditado em minhas ideias e estimulado a não parar nunca. Por sua dedicada orientação, competência e cumplicidade, amizade, tempo e atenção dispensada durante o desenvolvimento desta tese e pela confiança no resultado final desta pesquisa.

À Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto por ser um exemplo de profissional, competência e pela confiança no meu trabalho. Pelo crescimento que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Cleber Machado de Souza, pelos ensinamentos transmitidos desde o início da pesquisa laboratorial até a disponibilização dos resultados, pela paciência e dedicação.

Às amigas Dieila Giomo e Thaís Munhoz Pereira, estudantes de Odontologia da PUCPR que tanto me ajudaram na extração de DNA desta pesquisa.

Aos Profs. Drs. Everdan Carneiro, Ulisses Xavier da Silva Neto e Luiz Fernando Fariniuk pelos ensinamentos, troca e atenção durante o curso.

Ao Prof. Sergio Aparecido Ignácio por sua ajuda durante todo o período de meu mestrado e doutorado. Obrigado pelo carinho e educação com que sempre me recebeu.

Aos meus colegas de turma, por todo companheirismo compartilhado, nos fazendo crescer a cada dia.

Às secretárias de Pós-Graduação em Odontologia, Neide Reis Borges e Maria Nilce da Silva Reis por nos ajudar sempre com presteza.

Às secretárias da Clínica de Odontologia da PUCPR, Marilei Dias, Allan Rodrigo Gonçalves Cordeiro e Thays Amaral Xavier, Dayane Caroline da Silva Farias, pela atenção com os meus pacientes.

Às secretárias da Clínica III, Regina dos Santos Scheleider, Mônica Alves Carreri e Adilair Kiel por cuidarem tão bem de mim.

A todos os pacientes que colaboraram para a concretização deste trabalho.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
Add	Modelo aditivo
C	Citosina
CEU	População caucasiana
COX-2	Ciclooxigenase 2
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Fig.	Figura
G	Guanina
HCl	Ácido clorídrico
IADT	International Association of Dental Traumatology
IC	Intervalo de confiança
Ig	Imunoglobulina
<i>IL4</i>	Gene da interleucina 4
<i>IL6</i>	Gene da interleucina 6
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RANK	Receptor ativador de NFkB
RANKL	Ligante do receptor ativador de NFkB
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
RRAE	Reabsorção radicular apical externa
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T	Timina
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Treg	Linfócito T regulador

Tris

Hidroximetil aminometano

UTR

*Untranslated region*

YRI

População Yoruba (Africana)



## SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA PARA O PRESENTE TRABALHO.....	10
2. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	15
2.1 Página título .....	16
2.2 Resumo .....	17
2.3 Introdução .....	18
2.4 Objetivo.....	21
2.5 Material e Método.....	22
2.6 Resultados .....	26
2.7 Discussão.....	29
2.8 Conclusão .....	35
2.9 Referências.....	36
2.10 Tabelas.....	43
2.11 Figura.....	51
3. ARTIGO EM INGLÊS.....	52
3.1 Title page.....	53
3.2 Abstract .....	54
3.3 Introduction.....	55
3.4 Material and Methods.....	59
3.5 Results .....	61
3.6 Discussion .....	64
3.7 Conclusion.....	70
3.8 References .....	71
3.9 Tables.....	77
3.10 Figure.....	84
4. ANEXOS.....	85
4.1 Ilustrações.....	86
4.2 Parecer de Comitê de Ética.....	92
3.3 TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93

## JUSTIFICATIVA PARA O PRESENTE TRABALHO

Os traumatismos alvéolo-dentários são constantemente observados na prática clínica e atingem aproximadamente 14% das crianças e adolescentes (1). Situações como acidentes durante a prática de esportes, automobilísticos, de trabalho e brincadeiras podem levar à injúria facial, onde os dentes e sua estrutura de suporte são frequentemente afetados. A avulsão dentária, que consiste na saída completa do dente de seu alvéolo, representa cerca de 1 à 11% dos traumatismos dentários descritos na literatura mundial (2) e 13,6% dos casos na cidade de Curitiba, Brasil (3). O procedimento adequado a ser seguido nesta situação é a recolocação imediata do dente em seu alvéolo (4), porém isso nem sempre acontece.

Por consequência do trauma, e com a penetração e a proliferação de bactérias no microambiente local, uma reação inflamatória se instala no local, e sua intensidade determina a extensão do dano ao dente e sua estrutura de suporte (5). A reabsorção radicular, que pode ocorrer após o reimplante, representa o maior desafio na manutenção do dente reimplantado. Ela acontece principalmente quando ocorre a perda total ou parcial do ligamento periodontal, com comprometimento da viabilidade de suas células (6). Reabsorção radicular por substituição acontece quando o tecido dentário é progressivamente substituído pelo ósseo. Também pode ocorrer a reabsorção inflamatória, que está relacionada ao tecido pulpar infectado (7). As reabsorções ocorrem em 64-75,5% dos casos e podem levar à perda do reimplante (8).

Mediadores imuno-inflamatórios têm um papel modulador na reabsorção radicular dentária (9). Estudos prévios demonstram que um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias determinam a estabilidade ou progressão das lesões periapicais por meio da modulação do ligante do receptor ativador de NFkB (RANKL), do receptor ativador de NFkB (RANK) e do seu receptor antagonista, a osteoprotegerina (OPG). Desde que a citocina IL-4, de perfil anti-inflamatório, e a IL-6, predominantemente pró-inflamatório, são codificados por genes, realizou-se um estudo dos polimorfismos nos genes *IL4* e *IL6*, a fim de verificar a possível associação da predisposição genética do indivíduo à reabsorção radicular externa em dentes reimplantados.

Polimorfismos genéticos têm a habilidade, por exemplo, de alterar a interação de receptores celulares que participam da resposta imuno-inflamatória com seus ligantes e assim modificar a cadeia de sinalização subsequente, podendo ter efeito na expressão maior ou menor de um desfecho (10). Um gene pode ter vários locais polimórficos que atuam em sinergia, de modo que o estudo de um único polimorfismo, ou mesmo de uma única região do gene, apenas proporcionará uma visão parcial do efeito das variações genéticas deste gene (11). Considerando esta questão, este estudo utilizou uma abordagem de mapeamento físico completo dos genes *IL4* e *IL6*, que codificam duas citocinas importantes e de efeito anti e pró-inflamatório, respectivamente (12).

Os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), que são polimorfismos de troca de base única, parecem ser os responsáveis pela maior parte da variabilidade genética humana (Fig. 1), resultando em uma grande diversidade de respostas a fatores externos, tais como agressão bacteriana e terapia medicamentosa. Dessa forma, o aprofundamento do conhecimento acerca da complexa interação da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro com os fatores clínicos poderá elucidar o entendimento da atuação de mediadores inflamatórios na reabsorção radicular, o que poderá auxiliar no esclarecimento dos diferentes fenótipos e evoluções clínicas diversas. Isso poderá permitir, no futuro, prever com maior precisão a suscetibilidade a doenças/condições patológicas complexas e obter prognósticos mais acurados e positivos.

Assim, detectar marcadores genéticos, e no futuro, proteicos, ajudará na identificação de pacientes com maior risco à reabsorção radicular, mesmo antes de ser iniciado o tratamento endodôntico do dente reimplantado.

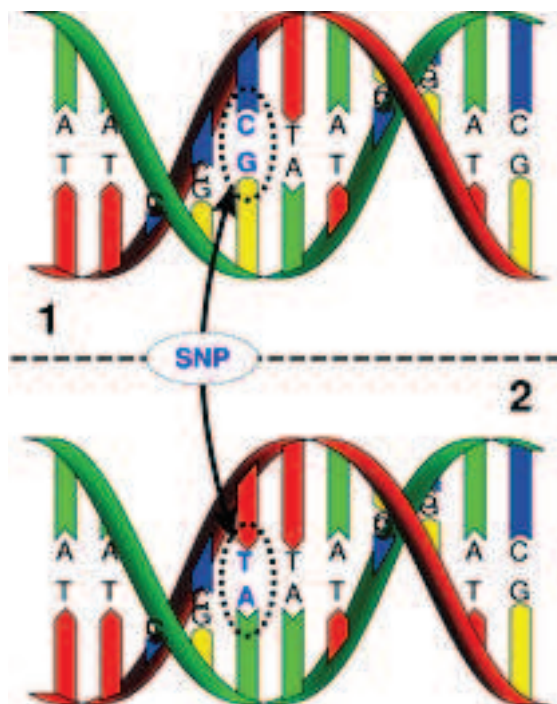


Figura 01: Desenho esquemático demonstrando a troca de base (SNP) em um *locus* do DNA (em:<https://www.geneticgenealogysig.org>).

## Referências

1. Andreasen J, Andreasen F. Dental trauma: quo vadis. *Tandlaegebladet*. 1989;93:381–4.
2. Andersson L. Tooth avulsion and replantation: Editorial. *Dent Traumatol*. 2007;23(3):129.
3. Fariniuk LF, Souza MH De, Westphalen VPD, Carneiro E, Silva Neto UX, Roskamp L, et al. Evaluation of care of dentoalveolar trauma. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(4):343–5.
4. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012 Apr;28(2):88–96.
5. Fuss Z, Tsesis I, Lin S. External root resorption - diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dent Traumatol*. 2003;19(4):175–82.
6. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995;11(2):76–89.
7. Finucane D, Kinirons MJ. External inflammatory and replacement resorption of luxated, and avulsed replanted permanent incisors: a review and case presentation. *Dent Traumatol*. 2003;19(3):170–4.
8. Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Endodontic considerations. *Dent Traumatol*. 2005;21(2):80–92.
9. Roskamp L, Westphalen VPD, Lima JHC, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, et al. The influence of atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Periodontol*. 2009;80(7):1121–4.
10. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SRP. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002 Jul;29(7):587–91.
11. Fontana MLSSN, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML, Thum L, et al. Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;142(3):339–47.
12. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and

inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(4):336–46.



**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS E POLIMORFISMOS NOS GENES  
*IL4* E *IL6* NA EVOLUÇÃO DO DENTE AVULSIONADO APÓS 1 ANO DE  
REIMPLANTE**

ROSKAMP L<sup>1</sup>, SOUZA CM<sup>1</sup>, TREVILATTO PC<sup>1</sup>, WESTPHALEN VPD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Correspondência: Vânia Portela Ditzel Westphalen. Departamento de Endodontia, Escola de Saúde e Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil, R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho – Curitiba – Pr, Brasil CEP: 80242.980. telefone: 55.41.3271.2525, e-mail: [vania.westphalen@pucpr.br](mailto:vania.westphalen@pucpr.br)

**TÍTULO RESUMIDO:**

Polimorfismo em *IL4* e *IL6* na reabsorção radicular do dente reimplantado

Os autores negam qualquer conflito de interesse.



## RESUMO

**Introdução:** A identificação de fatores implicados na iniciação e progressão da reabsorção radicular pós reimplante dentário demonstra o papel fundamental da resposta imuno-inflamatória do paciente. Contudo, poucos trabalhos investigando características clínicas, imunológicas e genéticas existem na literatura. **Objetivo:** Investigar a associação de variáveis clínicas e polimorfismos do tipo tag SNPs (polimorfismo de base única) no gene das interleucinas 4 (*IL4*) e 6 (*IL6*), com o prognóstico de dentes avulsionados e reimplantados. **Método:** A amostra foi composta por 94 pacientes, que sofreram avulsão e tiveram seus dentes reimplantados e tratados endodonticamente. Radiografias periapicais foram tomadas logo após o reimplante dentário e 1 ano de acompanhamento. Para a análise genotípica dos genes *IL4* e *IL6*, usou-se o ácido desoxirribonucleico (DNA) de células da mucosa bucal e a genotipagem realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. Para verificar a associação de variáveis clínicas e genéticas com a evolução do reimplante dentário ( $p < 0,05$ ), análises univariadas e multivariadas foram conduzidas. **Resultados:** Na análise univariada, a idade, o tempo extra-alveolar e o meio de armazenamento associaram-se à reabsorção radicular externa. Após a análise multivariada, o tempo extra-alveolar superior a uma hora e o alelo G do rs2069843 do gene *IL6* associaram-se significativamente com a reabsorção radicular externa. **Conclusão:** O tempo extra-alveolar inferior a uma hora foi fundamental para a manutenção da saúde do dente reimplantado. A recolocação imediata do dente em seu alvéolo continua sendo sugerida como a técnica de escolha de reimplante. O alelo G do rs2069843 do gene *IL6* foi associado com a susceptibilidade à reabsorção radicular externa do dente reimplantado.

**Palavras-chaves:** Avulsão dentária. Reimplante dentário. Reabsorção radicular. Citocinas. *IL4*. *IL6*. Polimorfismo de base única. Tag SNP

## INTRODUÇÃO

Os traumatismos alvéolo-dentários são constantemente observados na prática clínica e atingem aproximadamente 14% das crianças e adolescentes (1). Situações como acidentes durante a prática de esportes, automobilísticos, de trabalho e brincadeiras podem levar à injúria facial, onde os dentes e sua estrutura de suporte são frequentemente afetados. Estes traumas têm se tornado um problema de saúde pública, causando deficiências estéticas, psicológicas e sociais (2).

A severidade do traumatismo depende da energia e direção do agente causador, assim como da resistência dos tecidos de suporte e de características imuno-inflamatórias do paciente (3–5). Estes traumas, caso não sejam tratados adequadamente, podem gerar sequelas irreversíveis, chegando até à perda do dente (6–9).

Entre os traumatismos, a avulsão dentária é um dos mais graves. De acordo com a literatura, cerca de 1 a 11% dos traumatismos dentários resultam em avulsão, e sua maior incidência é entre os 7 e 15 anos (10).

Quando ocorre uma avulsão, a conduta mais indicada é o reimplante dentário, procedimento que visa recolocar o dente no seu alvéolo (8,11). A reabsorção radicular representa o maior desafio na prevenção e tratamento do dente reimplantado, principalmente na perda total ou parcial do ligamento periodontal, sobretudo quando as condições ideais ao sucesso do reimplante não ocorrem. Neste caso acontece a reabsorção por substituição, onde o tecido dentário é substituído pelo osso. Além desta, pode ocorrer a inflamatória que está relacionada ao tecido pulpar infectado (12). As complicações ocorrem em 64-75,5% dos casos e podem levar à perda do reimplante (13).

Assim sendo, a importância funcional e estética dos dentes avulsionados, associada à pouca idade dos pacientes, tem incentivado a busca de soluções mais efetivas, tanto em relação ao tratamento a ser realizado, quanto ao conhecimento e prevenção sobre prováveis causas da reabsorção radicular. É de fundamental importância informar ao paciente ou ao seu responsável sobre o que pode ser feito diante deste traumatismo e dos fatores que condicionam o seu prognóstico, como: tempo decorrido entre o trauma e o atendimento, solução onde o dente ficou armazenado antes do reimplante dentário, medicação

intracanal a ser utilizada e os possíveis sinais e sintomas que podem surgir em decorrência do trauma (14–16).

Diante de todos estes fatos clínicos, conclui-se que a intensidade da reação inflamatória desencadeada pela avulsão dentária seguida do reimplante e a penetração e proliferação de bactérias no microambiente local vão determinar as sequelas no tecido atingido. Assim sendo, a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro passa a ter fundamental importância (4,17–19).

Apresentando um papel importante na reabsorção radicular dentária e periapical encontram-se as citocinas IL-4 e IL-6. A citocina IL-4 (interleucina 4) possui importante papel anti-inflamatório. A citocina IL-6 (interleucina 6) exerce função reguladora em processos inflamatórios, sendo considerada uma importante citocina pró-inflamatória (20). Desde que a resposta imuno-inflamatória é orquestrada por citocinas que são produzidas pela codificação genética, pode-se supor ser válido um estudo associando características genéticas do indivíduo e sua resposta imuno-inflamatória.

Desta forma, o estudo focou em variações polimórficas dos genes *IL4* e *IL6*. Polimorfismos são variações nos genes, que podem impactar na quantidade ou função da proteína expressa, resultando em alterações da resposta imune inata e adaptativa, tanto determinando a proteção à doença, como o inverso (21). *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), ou seja, polimorfismos de nucleotídeos únicos, são as formas mais comuns de variação do ácido desoxirribonucleico (DNA) no genoma humano. Por consequência, os polimorfismos de genes que codificam citocinas e outras proteínas, podem influenciar a função imuno-inflamatória celular. Na presença de alelos específicos polimórficos, reações tanto locais como sistêmicas podem ser mais ou menos intensas e as complicações mais ou menos severas que na ausência destes determinados alelos, resultando em alterações na resposta imune inata ou adaptativa, sendo determinantes no curso da doença (21,22).

Recentemente, uma abordagem genética que se utiliza de SNPs em desequilíbrio de ligação (DL) está sendo aplicada nos estudos que envolvem a genética. Essa abordagem permite que não seja necessário genotipar todos os polimorfismos presentes em um determinado gene, mas apenas SNPs “alvos” (tag SNP), que capturam toda a informação do gene em termos de variabilidade

realizando a investigação com um menor número de polimorfismos, reduzindo custo e tempo de genotipagem (23).

Deste modo, partindo-se do princípio de que mediadores imuno-inflamatórios, entre eles a IL-4 e 6, são codificadas por genes, a hipótese do presente trabalho é que polimorfismos genéticos nos genes *IL4* e *IL6* possam estar associados com a evolução clínica de dentes avulsionados e reimplantados em um ano de controle clínico e radiográfico.

## OBJETIVO

Investigar a associação de variáveis clínicas e polimorfismos do tipo tag SNPs nos genes das citocinas interleucina 4 (*IL-4*) e interleucina 6 (*IL-6*) com a evolução de dentes avulsionados e reimplantados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *População de estudo*

Foram selecionados 94 pacientes (64 do gênero masculino e 30 do feminino) que sofreram avulsão e reimplante dentário entre 2004 e 2014. Os pacientes tiveram seu dente reimplantado com diferentes intervalos de tempo extra-alveolar e diferentes meios de estocagem até o reimplante, segundo recomendações da *International Association of Dental Traumatology* (IADT) (7).

Os dentes reimplantados foram divididos em: grupo controle, que consistiu em 54 dentes sem reabsorção dentária e grupo caso que correspondeu a 40 dentes que apresentaram reabsorção ou foram extraídos após 1 ano de controle clínico e radiográfico.

Os objetivos e procedimentos deste estudo foram esclarecidos para todos os pacientes e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de cada paciente foi assinado. Este trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR com o número de CEP 02320084000-10.

### *Crítérios de inclusão*

1. Pacientes, de ambos os sexos, tratados na Clínica Odontológica da PUCPR, em virtude de reimplante dentário pós-avulsão em decorrência de trauma dentário.
2. Dentes permanentes reimplantados, controlados clínica e radiograficamente por um período mínimo de 1 ano.
3. Pacientes com boa higiene bucal.
4. Pacientes que perderam seus dentes reimplantados somente em virtude de reabsorção radicular externa.

### *Crítérios de não inclusão*

1. Portadores de doença periodontal.
2. Outras doenças de tecido mole ou duro na boca.
3. Pacientes que faziam uso de medicação de uso contínuo.
4. Pacientes que usavam ou tinham usado aparelhos ortodônticos.

5. Pacientes imuno-comprometidos por doenças autoimunes, quimioterapia, doenças infecciosas, parasitárias ou imunodeficiências.
6. Pacientes fumantes.
7. Gestantes ou lactantes.

As radiografias periapicais dos dentes reimplantados que foram selecionadas para este estudo foram confeccionadas com posicionadores radiográficos da marca JON (São Paulo - SP, Brasil) logo após o reimplante e 1 ano após. A avaliação clínica e radiográfica qualitativa de cada paciente foi feita por 3 endodontistas, sendo 2 doutores e 1 mestre. A análise de concordância entre os 3 examinadores foi realizada. Sinais como presença ou ausência radiográfica de reabsorção radicular externa, presença completa ou sinais de solução de continuidade da lâmina dura, anquilose, mobilidade, respostas à percussão horizontal e vertical, presença ou ausência de dor espontânea ou à palpação foram cuidadosamente anotados e avaliados.

Embora a amostra do estudo seja composta por caucasoides, a população brasileira branca é heterogênea. Não se têm recomendado agrupar brasileiros com base na etnia, cor e origem geográfica, porque os indivíduos brasileiros classificados como brancos ou negros apresentam sobreposição de genótipos, devido à miscigenação (24).

### ***Análise de variáveis clínicas e ambientais***

As variáveis demográficas, como idade e gênero dos pacientes, assim como as clínicas: nível de desenvolvimento radicular, tempo extra alveolar e meio de conservação do dente até a finalização do reimplante foram analisadas no prognóstico do dente após 1 ano.

### ***Coleta e purificação do DNA***

Os indivíduos selecionados foram solicitados para bochechar durante um minuto com uma solução de glicose 3%. Após o bochecho, uma espátula de madeira esterilizada foi utilizada para raspar a mucosa jugal (25,26). A ponta da espátula foi então agitada dentro da solução de bochecho. Células epiteliais bucais foram sedimentadas por centrifugação a 2000 rpm durante 10 min. O

sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspense em 1300 ml de tampão de extração [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. Posteriormente 10 µl de proteinase K (20 mg/ml) foram adicionados à solução, sendo deixados durante a noite a 65°C. O DNA foi purificado por adição de acetato de amônio 10 M, precipitado com isopropanol, etanol 70% e ressuspense com 50 µl de Tris 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1 mM (25).

### **Análise de polimorfismos nos genes *IL4* e *IL6***

Marcadores do tipo tag SNP, capturando toda a informação dos genes *IL4* e *IL6* foram selecionados, de acordo com a informação disponível no site *International HapMap Project, phase III/Rel#2* (<http://www.hapmap.org>, 2014) (27,28). Na seleção dos marcadores usou-se alguns critérios, tais como: população, frequência alélica mínima (FAM) de 5% e um corte de 80% ( $r^2 < 0,8$ ) para definir o desequilíbrio de ligação (DL), de modo que os genes fossem investigados com detalhes. Para o gene *IL4*, a população de base foi a população CEU (Caucasiana) e para a *IL6* a população de base foi a YRI (Africana). Após a aplicação dos critérios acima, dois tag SNPs, capturando toda a informação do gene *IL4* foram selecionados pelo HapMap: *reference* (rs) SNP rs2243268 e rs2227284. Para a *IL6*, oito tag SNPs foram selecionados: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843 e rs2069845.

Os tag SNPs selecionados foram genotipados pela técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 da Applied Biosystems (7500 Real-Time PCR System) com o uso da tecnologia TaqMan™ Genotyping Master Mix Technology (Applied Biosystems).

### **Análise estatística**

Para estimar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e realizar a análise de desequilíbrio de ligação (DL) na população de estudo utilizou-se o software Haploview 4.2. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS versão 21.0. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi usado para analisar as variáveis quantitativas. Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste *qui-quadrado* de Pearson ou teste exato de Fisher. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados



significantes. Para a análise multivariada, o modelo de regressão logística binária foi ajustado para analisar as frequências genotípicas, incluindo as variáveis com significância de  $p < 0,20$ .

## RESULTADOS

### *Características clínicas e ambientais*

A idade dos pacientes que tiveram seus dentes avaliados variou de 5 a 50 anos. A média de idade foi de 14 anos e a mediana, 11 anos. Setenta e cinco pacientes (79,8%) eram menores de 18 anos. Pacientes mais jovens apresentaram mais reabsorção/exodontia ( $p=0,021$ ) (Tabela 1).

O gênero masculino demonstrou sofrer mais avulsões e reimplantes que o feminino, porém sem diferença estatisticamente significativa quanto à presença ou ausência de reabsorção radicular externa ( $p=0,429$ ) (Tabela 1).

Dos 94 pacientes, 54 (57,4%) permaneceram sem reabsorção, 26 apresentaram reabsorção (27,7%) e 14 (14,9%) dentes foram extraídos após 1 ano de reimplante.

Dos 94 pacientes, 69 (73,4%) apresentaram dentes com rizogênese completa. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem reabsorção/exodontia no nível de desenvolvimento radicular no momento do reimplante ( $p=0,520$ ) (Tabela 1). Dos 69 reimplantes com rizogênese completa, 41 (59,4%) permaneceram sem reabsorção e 28 (40,6%) apresentaram reabsorção ou foram extraídos. Encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $p=0,007$ ) somente nos dentes com rizogênese completa reimplantados em menos de uma hora entre os grupos sem reabsorção e com reabsorção / extraídos (Tabela 2). Dos 31 (45,0%) dentes, 24 (34,8%), não apresentaram reabsorção radicular externa, e 7 (10,2%), sim. Dos 25 dentes com ápices abertos, 13 (52,0%) ficaram sem reabsorção e 12 (48,0%) tiveram reabsorção ou foram extraídos. Dos 25, 14 dentes com rizogênese incompleta que foram reimplantados em menos de uma hora, 9 (64,3%) dentes não apresentaram reabsorção e 5 dentes (35,7%) apresentaram reabsorção. Dos 9 dentes sem reabsorção, 4 (44,4%) dentes sofreram revascularização pulpar. Dos 11 dentes com rizogênese incompleta que foram reimplantados após 1 hora, 4 (36,4%) não apresentaram reabsorção, 5 (45,4%) sim e 2 (18,2%) dentes foram extraídos.

Do total de 94 pacientes com dentes avulsionados, 45 (47,9%) foram reimplantados em menos de uma hora de tempo extra-alveolar. Nos meios considerados adequados pela IADT (alvéolo e leite), 22 (48,9%) foram mantidos

no alvéolo, e 3 (6,7%) permaneceram no leite. Dos outros dentes armazenados em meios considerados inadequados, 10 (22,2%) foram armazenados secos, 2 (4,4%) no soro fisiológico, 3 (6,7%) na saliva, 1 (2,2%) na água, 3 (6,7%) no gelo e 1 (2,2%) em meio desconhecido até o seu reimplante. Permaneceram sem reabsorção radicular externa 33 (73,4%) dentes e 11 (24,4%) dentes apresentaram reabsorção. Apenas 1 (2,2%) paciente, que teve seu dente mantido no soro fisiológico por menos de 1 hora, teve seu dente extraído.

Quarenta e nove (52,1%) dentes foram reimplantados com tempo superior a uma hora após a avulsão. Destes, 11 (22,5%) foram mantidos em leite até o reimplante. Dos demais, 32 (65,3%) foram estocados secos, 5 (10,2%) no soro fisiológico e 1 (2,0%) em meio desconhecido. Dos 49 pacientes, 21 (42,9%) permaneceram sem reabsorção radicular externa, 15 (30,6%) tiveram reabsorção e 13 dentes foram extraídos (26,5%).

Além do tempo extra-alveolar, também, encontrou-se diferença estatisticamente significativa para os meios de conservação utilizados para a colocação do dente avulsionado até o seu posicionamento correto no alvéolo ( $p=0,020$ ). O meio de conservação no alvéolo mostrou-se significativamente associado ao sucesso do reimplante: dos 22 dentes que foram colocados no alvéolo até a finalização do reimplante, 19 (86,4%) permaneceram sem reabsorção e 3 (13,6%) com reabsorção. Por outro lado, o transporte do dente em meio seco demonstrou estar significativamente associado à reabsorção/exodontia: dos 42 transportados secos, 17 (40,5%) permaneceram sem reabsorção e 25 (59,5%) com reabsorção/exodontia após 1 ano (Tabela 3).

Dentes reimplantados com tempo extra-alveolar inferior a 1 hora apresentaram menos reabsorção radicular externa ( $p=0,003$ ) que dentes reimplantados com tempo superior a 1 hora (Tabela 1).

### **Análise genética**

A distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos estudados está apresentada nas tabelas 4 e 5. As frequências genotípicas dos marcadores testados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. A análise do desequilíbrio de ligação confirmou independência entre os marcadores ( $r^2 < 0,8$ ). O mapa de desequilíbrio de ligação da população estudada para os genes *IL4* e *IL6* está mostrado na figura 1.

Apenas um polimorfismo tag SNP, o rs2069837 do gene *IL6*, não funcionou na genotipagem. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem reabsorção radicular externa/exodontia para nenhum dos tag SNPs estudados nos genes *IL4* e *IL6* (Tabela 4 e 5). Encontrou-se resultado limítrofe para o modelo aditivo do rs2069843 no gene *IL6* ( $p=0,085$ ) e para o modelo dominante para o alelo G deste mesmo polimorfismo ( $p=0,077$ ), no sentido de predisposição à reabsorção radicular externa. De fato, dos dentes reimplantados em condições ideais (tempo extra-alveolar inferior a uma hora e meio de estocagem alvéolo/leite), todos os que apresentaram reabsorção radicular/exodontia possuíam o genótipo G/G.

### ***Análise multivariada***

Entre todas as variáveis estudadas que foram selecionadas para comporem a análise multivariada (variáveis com  $p<0,200$ ), apenas o tempo extra-alveolar ( $p<0,002$ ) e o modelo aditivo do rs2069843 do gene *IL6* ( $p<0,049$ ) mostraram-se associados à reabsorção radicular/exodontia (Tabela 6). Após análise multivariada, dentes com tempo extra-alveolar inferior a 1 hora apresentaram chance 4,11 vezes maior de evoluírem favoravelmente [ $p=0,002$  (1,7-10,1)].

## DISCUSSÃO

A literatura carece de estudos que investiguem a associação entre polimorfismos genéticos e a reabsorção radicular após reimplante dentário. Neste estudo, pela primeira vez, realizou-se uma abordagem visando um mapeamento físico completo dos genes *IL4* e *IL6* em uma amostra de casos de reimplante dento-alveolar.

O uso da radiografia periapical ainda é a melhor maneira clínica em relação custo/benefício para detectar a presença de reabsorções radiculares (29). No entanto, ela apresenta pontos negativos, como imagem em duas dimensões de uma estrutura tridimensional. Sendo assim, como são necessários controles clínicos e radiográficos constantes do dente reimplantado no decorrer do tempo, o uso da tomografia *cone beam* (CBCT) pode ser de grande valia, principalmente devido à sua capacidade de demonstrar o dente em três dimensões, facilitando a detecção da reabsorção radicular ainda em seu início e em comparações posteriores (29). Infelizmente, além do aumento da dose de radiação para o paciente e da inferior qualidade de resolução de imagem, essa técnica ainda não apresenta uma relação custo/benefício satisfatória para a maioria das clínicas odontológicas, estando assim longe da realidade cotidiana do país. De qualquer forma, independentemente da técnica radiográfica, um completo exame clínico e radiográfico, sugerido desde 1985, é condição indispensável para um efetivo diagnóstico do dente traumatizado (30).

Os pacientes deste estudo eram em sua maioria menores que 18 anos. Conforme a literatura, pacientes mais jovens sofrem mais avulsão dentária do que o adulto (31,32). Além disso, nesse estudo, pacientes mais jovens, com média de idade de 12 anos, tiveram mais reabsorção radicular/exodontia que os pacientes mais velhos. Isto pode ocorrer devido à fase de crescimento que o paciente se encontra, com metabolismo ósseo mais intenso.

Com relação ao gênero, o masculino sofreu mais reimplante dentário [64 (71,1%) dentes] do que o feminino [30 (31,9%)] dentes, porém, não se constatou diferença estatisticamente significativa entre os gêneros quanto à presença ou ausência de reabsorção radicular externa (9,31). Este resultado está em concordância com outros autores (31).

Assim como os resultados de Tsilingaridis *et al.* (33), não foi observada diferença significativa na presença ou ausência de reabsorção dentária em dentes com rizogênese completa ou incompleta, após 1 ano de controle clínico e radiográfico. Este resultado não foi o mesmo encontrado por Petrovic *et al.* (34) em avaliação de dentes reimplantados que ficaram em meio seco, onde os autores encontraram significativamente mais complicações em dentes imaturos do que naqueles com rizogênese completa. O meio de armazenamento seco pode ter sido decisivo na diferença destes dois resultados. Entretanto, nesta pesquisa, encontrou-se diferença estatisticamente significativa apenas nos dentes com ápices completos entre os grupos sem e com reabsorção/exodontia, somente quando reimplantados com tempo extra-alveolar inferior a uma hora, assim como demonstrado por Petrovic *et al.* (34).

Neste estudo verificou-se que o tempo extra-alveolar inferior a uma hora foi responsável por 4 vezes mais chance do dente apresentar sucesso em sua evolução. A importância do tempo extra-alveolar inferior a uma hora também foi decisiva para a revascularização do dente avulsionado. Dos 13 dentes com rizogênese incompleta que não sofreram reabsorção, 4 (30,8%) dentes, os quais tiveram tempo extra-alveolar inferior a uma hora, sofreram revascularização pulpar, não havendo necessidade de qualquer intervenção endodôntica. Por outro lado, nenhum dente com rizogênese incompleta que permaneceu fora do alvéolo por mais de uma hora sofreu revascularização. O tempo extra-alveolar inferior a uma hora é indicado como ideal no protocolo de reimplante dentário publicado pela IADT (7,8,35). Neste estudo, dos 45 dentes que foram reimplantados em menos de uma hora, somente 1 (2,2%) foi extraído após 1 ano de acompanhamento. Esse sucesso coincide com as medidas tomadas em caso de reimplante imediato, o que já é preconizado pela comunidade científica (7,8).

O meio seco foi o que apresentou o pior prognóstico, com maior índice de reabsorção/exodontia. Estes resultados estão de acordo com outros autores (5,36,37). Por outro lado, a recolocação do dente em seu alvéolo foi o procedimento mais bem-sucedido, por motivo do reimplante imediato ser considerado pela IADT como o método de reimplante ideal. As altas porcentagens de reabsorção radicular/exodontia obtidas neste estudo, quando o dente permaneceu fora de seu alvéolo por mais de 1 hora, sugerem a necessidade do desenvolvimento de novos meios de estocagem ou modificação

da técnica de reimplante. Alcançar melhor desempenho no reimplante dentário, utilizando produtos e técnicas que mantenham ou recuperem a viabilidade do ligamento periodontal, tem sido o foco de diversas pesquisas (38–41).

Fatores genéticos que predisõem às reabsorções de tecidos duros têm sido investigados nas áreas da ortodontia, periodontia e endodontia (42–46). Apesar da literatura oferecer estudos de associação genética com a reabsorção radicular apical externa (RRAE) em dentes tratados ortodonticamente, acredita-se que estes estudos não deveriam servir como base direta de comparação ao que ocorre com o dente reimplantado, devido às características da reabsorção dentária. No caso da ortodontia, a RRAE é auto limitante (47). Além disso, não existe a participação de bactérias que levarão à resposta imunológica. Em casos de reimplante, a reabsorção substitutiva é contínua, podendo levar à perda do dente. O tecido dentário é substituído, como que fazendo parte do metabolismo ósseo, por outro tecido duro, com solução de continuidade da lâmina dura. A combinação da presença de bactérias com o dano à camada de cimento pode levar também à reabsorção radicular inflamatória. Nestes casos, observa-se uma destruição do tecido ósseo e dentário adjacentes, com a presença de tecido de granulação em resposta à reação inflamatória local (48,49).

Estudos investigam a associação entre polimorfismos genéticos da IL-1 e a RRAE (44–46). No entanto, esta associação não foi encontrada no reparo da periodontite apical, onde ocorre a participação de bactérias como um estímulo a mais à resposta imuno-inflamatória (50). Assim sendo, mesmo que com possíveis particularidades, acredita-se que o mecanismo de reabsorção dentária após o reimplante é mais semelhante ao da periodontite apical ou doença periodontal do que àquele observado no tratamento ortodôntico (51,52).

Estudos prévios demonstram que um balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios determinam a estabilidade ou progressão das lesões periapicais por meio da modulação do ligante do receptor ativador de NFkB (RANKL), do receptor ativador de NFkB (RANK) e do seu receptor antagonista, a osteoprotegerina (OPG) (20,53,54). Entretanto, acredita-se que a rede de citocinas que opera na reabsorção de tecido duro, especialmente dentário, seja mais complexa do que o simples paradigma de mediadores pró e anti-inflamatórios sugere (55).

A IL-4 é uma das citocinas anti-inflamatórias que possui um papel importante nas doenças alérgicas, em virtude de sua capacidade em iniciar, manter e aumentar as respostas de linfócitos T helper 2 (Th2) (19). Tem como função principal o estímulo à produção da Imunoglobulina E (IgE) e da Imunoglobulina G (IgG). Atua sobre os mastócitos e basófilos que, quando ativados, produzem ainda mais IL-4 e IL-13. Sendo uma citocina típica do perfil imunológico Th2, é um mediador protetor da reabsorção de tecido duro devido à sua capacidade de aumentar os níveis de OPG e inibir o RANKL, suprimir as respostas pró-inflamatórias e aquelas do tipo linfócitos T helper 1 (Th1), inclusive diminuindo a ação de macrófagos (56). Os linfócitos T reguladores (Tregs) e as citocinas Th2, como a IL-4, estão associados à atenuação da progressão da doença periodontal (57) e à inatividade das lesões periapicais (20).

O gene *IL4* está localizado no braço longo do cromossomo 5 na região 5q31.1, juntamente com outros genes de citocinas Th2 (58). Vários estudos envolvendo o polimorfismo desta citocina têm sido realizados para avaliar o seu papel na destruição de tecido ósseo, sendo que autores reportam que polimorfismos no gene *IL4* não estão relacionados à doença periodontal (56,59). Entretanto, um estudo de meta-análise sobre os polimorfismos genéticos -590C/T e -33C/T do gene *IL4* e a susceptibilidade à periodontite sugeriu que o genótipo TT e alelo T do -590C/T estavam associados ao aumento do risco à periodontite em indivíduos brancos, mas não o polimorfismo -33C/T (58).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, sintetizada por vários tipos de células, como monócitos e macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e linfócitos (60). Pode ser considerada tanto uma citocina pró quanto anti-inflamatória, produzida por estímulos como o trauma e a infecção. Estimula a ativação de linfócitos T, a diferenciação de linfócitos B e produção de anticorpos. Promove a produção de proteínas de fase aguda, a hematopoese e a indução de processos relacionados à angiogênese. Atuando com características pró-inflamatórias, ela ativa os osteoclastos, promovendo a reabsorção óssea na presença de infecções (60). É uma das citocinas de fase aguda mais estudadas na maioria das doenças de cunho imuno-inflamatório. Foi sugerida como um marcador inflamatório da periodontite (61) e também de lesões apicais crônicas (62).



O gene *IL6* está localizado no braço curto do cromossomo 7 na região 7p21.1. Os polimorfismos do gene da IL-6 afetam o nível de IL-6 circulante, sendo que a variação G>C na posição -174 foi encontrada influenciando a produção e a expressão desta citocina (63). O alelo C revelou alterar a resposta de transcrição do gene frente a estímulos como lipopolissacarídeos (LPS) e IL-1 (64). Observou-se uma significativa associação entre o genótipo GG ou o alelo G para o polimorfismo -174 (G/C) do gene *IL6* e sua presença em abscessos dentais agudos (65). Em relação à periodontite crônica, também foi sugerido que o polimorfismo -174 (G/G) esteja relacionado à sua patogênese (66).

Neste estudo, houve um resultado limítrofe para o rs2069843 do gene *IL6* na análise entre os grupos sem reabsorção e com reabsorção/exodontia. Esse resultado pode indicar uma tendência de associação com a reabsorção radicular externa na população estudada, quando na presença de variáveis clínicas, tal como idade, tempo extra-alveolar e meio de armazenamento. Foi encontrada associação significativa entre o rs2069843 e a RRAE em um estudo com pacientes classe II, divisão 1 de mal oclusão durante o uso de aparelho ortodôntico (67), mas também com sinais e sintomas relacionados à qualidade de vida de pacientes portadores de câncer de pulmão (68) e o nascimento de bebês menores que o esperado para a idade gestacional em mulheres europeias e afro-americanas (69), demonstrando seu papel não apenas no metabolismo de tecidos duros. De fato, dos dentes reimplantados em condições ideais (tempo extra-alveolar inferior a uma hora e meio de estocagem alvéolo/leite), todos os que apresentaram reabsorção radicular/exodontia possuíam o genótipo GG no rs2069843 do gene *IL6*.

A interpretação dos resultados deste estudo, no entanto, deve ser tratada com parcimônia, por se tratar de uma condição complexa e provavelmente poligênica, em que uma forte interferência do manuseio e tratamento do dente reimplantado e modulação genética podem coexistir. Na realidade, nem sempre é possível estabelecer uma relação direta entre fenótipo e genótipo, devido à influência de diferentes fatores ambientais, como tempo extra-alveolar, meio de armazenamento do dente até o reimplante e intervalo de tempo até a primeira limpeza do canal radicular. Além disso, este estudo tem limitações: a amostra populacional é pequena, pois, em Curitiba e região metropolitana, a avulsão dentária ocorre em aproximadamente 13,6% dos traumatismos e nem sempre o

dente é reimplantado (31). De qualquer forma, a Clínica Odontológica da PUCPR é um centro de referência de trauma dentário no sul do país. Possivelmente, um número maior da amostra poderia reduzir o erro padrão da média, tendendo a validar os resultados de diferenças estatisticamente significantes. Assim sendo, tal como para todos os estudos epidemiológicos de associação genética, a replicação destes resultados em amostras populacionais independentes torna-se obrigatória.

## CONCLUSÃO

O tempo extra-alveolar inferior a uma hora foi fundamental para a manutenção da saúde do dente reimplantado. A recolocação imediata do dente em seu alvéolo continua sendo sugerida como a técnica de escolha de reimplante. O alelo G do rs2069843 do gene *IL6* foi associado com a susceptibilidade à reabsorção radicular externa do dente reimplantado.

## REFERÊNCIAS

1. Andreasen J, Andreasen F. Dental trauma: quo vadis. *Tandlaegebladet*. 1989;93:381–4.
2. Moysés SJST, Camilotti AG, Vetorello M. Spatial analysis of dental trauma in 12-year-old schoolchildren in Curitiba, Brazil. *Dent Traumatol*. 2008;24(4):449–53.
3. Kramer PF, Feldens EG, Bruch CM, Ferreira SH, Feldens CA. Clarifying the effect of behavioral and clinical factors on traumatic dental injuries in childhood: a hierarchical approach. *Dent Traumatol*. 2015;31(3):177–83.
4. Roskamp L, Westphalen VPD, Lima JHC, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, et al. The influence of atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Periodontol*. 2009;80(7):1121–4.
5. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol*. 2013;29(1):15–22.
6. Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. I. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2007;23:66–71.
7. Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2007;23:130–6.
8. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2012 Apr;28(2):88–96.
9. Ritwik P, Massey C, Hagan J. Epidemiology and outcomes of dental trauma cases from an urban pediatric emergency department. *Dent Traumatol*. 2015;31(2):97–102.
10. Andersson L. Tooth avulsion and replantation: Editorial. *Dent Traumatol*. 2007;23(3):129.

11. Westphalen VPD, Martins WD, Deonizio MDA, da Silva Neto UX, da Cunha CB, Fariniuk LF, et al. Knowledge of general practitioners dentists about the emergency management of dental avulsion in Curitiba, Brazil. *J Dent Traumatol.* 2007;23(23):6–8.
12. Martins WD, Westphalen VPD, Westphalen FH. Tooth replantation after traumatic avulsion: a 27-year follow up. *Dent Traumatol.* 2004;20(2):101–5.
13. Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Endodontic considerations. *Dent Traumatol.* 2005;21(2):80–92.
14. Blomlöf L, Lindskog S, Andersson L, Hedström KG, Hammarström L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res.* 1983;62(8):912–6.
15. von Büren A, Krastl G, Kühl S, Filippi A. Management of avulsions in Switzerland 2007-2010. *Dent Traumatol.* 2013;30(3):176–81.
16. de Paula Reis MV, Moura CCG, Soares PBF, Leoni GB, Souza-Neto MD, Barbosa DZ, et al. Histologic and Micro-Computed Tomographic Analyses of Replanted Teeth Stored in Different Kind of Media. *J Endod.* 2014;40(5):665–9.
17. Roskamp L, Westphalen VD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, Westphalen FH. Relationship between extra-alveolar time and atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *J Trauma.* 2010;69(6):E79–81.
18. Roskamp L, Westphalen VPD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX. The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. *J Endod.* 2011;37(4):463–5.
19. Romeo MJ, Agrawal R, Pomés A, Woodfolk JA. A molecular perspective on TH2-promoting cytokine receptors in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(4):952–60.
20. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AMF, Letra A, et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(4):336–46.

21. Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000*. 2012;58(1):37–68.
22. Gomes MS, Blattner TC, Sant’Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2013;39(10):1205–17.
23. Stram DO. Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol*. 2004;27(4):365–74.
24. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):177–82.
25. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18:148–52.
26. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000;18(1):6–9.
27. Chelala C, Khan A, Lemoine NR. SNPnexus: a web database for functional annotation of newly discovered and public domain single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*. 2009;25(5):655–61.
28. Thorisson GA, Smith A V, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Res*. 2005 Nov;15(11):1592–3.
29. Bernardes RA, de Paulo RS, Pereira LO, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, de Azevedo JR. Comparative study of cone beam computed tomography and intraoral periapical radiographs in diagnosis of lingual-simulated external root resorptions. *Dent Traumatol*. 2012;28(4):268–72.
30. Andreasen FM, Kahler B. Diagnosis of acute dental trauma: the importance of standardized documentation: a review. *Dent Traumatol*. 2015;31(5):340–9.
31. Fariniuk LF, Souza MH, Westphalen VP, Carneiro E, Silva Neto UX, Roskamp L, et al. Evaluation of care of dentoalveolar trauma. *J Appl Oral Sci*. 2010;18:343–5.

32. Nguyen PMT, Kenny DJ, Barrett EJ. Socio-economic burden of permanent incisor replantation on children and parents. *Dent Traumatol.* 2004;20(3):123–33.
33. Tsilingaridis G, Malmgren B, Skutberg C, Malmgren O. The effect of topical treatment with doxycycline compared to saline on 66 avulsed permanent teeth - a retrospective case-control study. *Dent Traumatol.* 2015;31(3):171–6.
34. Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2010;26(1):52–9.
35. Andersson L, Bodin I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes-- a long-term clinical follow-up study. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(1):37–42.
36. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol.* 1995;11(2):76–89.
37. Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sottovia AD, Okamoto T. Tooth replantation after keeping the avulsed tooth in oral environment: Case report of a 3-year follow-up. *Dent Traumatol.* 2008;24(3):373–6.
38. Macway-Gomez S, Lallier TE. Pedialyte promotes periodontal ligament cell survival and motility. *J Endod.* 2013;39(2):202–7.
39. Tuna EB, Arai K, Tekkesin MS, Seymen F, Gencay K, Kuboyama N, et al. Effect of fibroblast growth factor and enamel matrix derivative treatment on root resorption after delayed replantation. *Dent Traumatol.* 2015;31(1):49–56.
40. Subramaniam P, Girija P, Eswara U, Girish Babu KL. Oral rehydration salt-liquid as a storage medium for avulsed tooth. *Dent Traumatol.* 2015 Feb;31(1):62–6.
41. Zhao Y-H, Zhang M, Liu N-X, Lv X, Zhang J, Chen F-M, et al. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials.* 2013;34(22):5506–20.
42. Fontana MLSSN, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML,

- Thum L, et al. Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;142(3):339–47.
43. Nibali L, Donos N, Farrell S, Ready D, Pratten J, Tu YK, et al. Association between interleukin-6 -174 polymorphism and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010;81:1814–9.
  44. Bastos J V, Côrtes MIS, Silva JFC, Goulart EMA, Colosimo EA, Gomez RS, et al. A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *Int Endod J.* 2015 Sep;48(9):878–87.
  45. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJP, Gontijo AI, et al. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2009;136(4):542–6.
  46. Al-Qawasmi R a, Hartsfield JK, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(3):242–52.
  47. Fuss Z, Tsesis I, Lin S. Root resorption - diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dent Traumatol.* 2003;19(4):175–82.
  48. Finucane D, Kinirons MJ. External inflammatory and replacement resorption of luxated, and avulsed replanted permanent incisors: a review and case presentation. *Dent Traumatol.* 2003;19(3):170–4.
  49. Lin YP, Love RM, Friedlander LT, Shang HF, Pai MH. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and the OPG-RANKL-RANK system in inflammatory external root resorption and external cervical resorption. *Int Endod J.* 2013;46(10):971–81.
  50. Siqueira JF, Rôças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC. Relationship Between Fcy Receptor and Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod.* 2009;35(9):1186–92.
  51. Trevilatto PC, de Souza Pardo AP, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, et al. Association of IL1 gene



- polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. *Arch Oral Biol.* Elsevier Ltd; 2011;56(1):54–62.
52. Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gómez M, Torres O, Flórez L, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J.* 2013;46(1):71–8.
  53. Xie X, Ma S, Li C, Liu P, Wang H, Chen L, et al. Expression of Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs) in the reparative dentin of rat molars. *Dent Traumatol.* 2014;30(4):285–95.
  54. Armada L, Marotta P dos S, Pires FR, Siqueira JF. Expression and Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. *J Endod.* 2015;41(8):1281–7.
  55. Cavalla F, Araujo-Pires AC, Bigueti CC, Garlet GP. Cytokine Networks Regulating Inflammation and Immune Defense in the Oral Cavity. *Curr Oral Heal Reports.* 2014;1(2):104–13.
  56. Anovazzi G, Finoti LS, Corbi SCT, Kim YJ, Marcaccini AM, Gerlach RF, et al. Interleukin 4 haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis are associated with IL-4 protein levels but not with clinical outcomes of periodontal therapy. *Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;* 2013;74(12):1688–95.
  57. Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Bigueti CC, Glowacki A, Yoshizawa S, et al. IL-4/CCL22/CCR4 Axis Controls Regulatory T-Cell Migration That Suppresses Inflammatory Bone Loss in Murine Experimental Periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2015;30(3):412–22.
  58. Yan Y, Weng H, Shen Z-H, Wu L, Zeng X-T. Association between interleukin-4 gene -590 c/t, -33 c/t, and 70-base-pair polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2014;85(11):e354–62.
  59. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SRP. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003;30(4):341–5.
  60. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.*

2014;47(7):615–21.

61. Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G. Analysis of YKL-40 Acute-Phase Protein and Interleukin-6 Levels in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2014;85(9):1240–6.
62. Abdolsamadi HR, Vahedi M, Esmaili F, Nazari S, Abdollahzadeh S. Serum Interleukin-6 as a Serologic Marker of Chronic Periapical Lesions: A Case-control Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect.* 2008;2(2):43–7.
63. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene Polymorphisms in Chronic Periodontitis. *Int J Dent.* 2010;2010:1–22.
64. Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1369–76.
65. Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J.* 2007;40:563–72.
66. Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, de Souza AP, Line SRP. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2003;30:438–42.
67. Reichow AM. Análise da associação entre aspectos clínicos e polimorfismos no gene da IL-6 e a susceptibilidade à perda de mini-implantes para ancoragem ortodôntica. Curitiba, Brasil:PUCPR; 2012.
68. Rausch SM, Clark MM, Patten C, Liu H, Felten S, Li Y, et al. Relationship between cytokine gene single nucleotide polymorphisms and symptom burden and quality of life in lung cancer survivors. *Cancer.* 2010;116(17):4103–13.
69. Harmon QE, Engel SM, Wu MC, Moran TM, Luo J, Stuebe AM, et al. Polymorphisms in Inflammatory Genes are Associated with Term Small for Gestational Age and Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2014 May;71(5):472–84.

**TABELAS**

**Tabela 1:** Características demográficas e clínicas da população estudada.

Variável	Sem reabsorção (n=54)	Com reabsorção/exodontia (n=40)	Valor de p	OR (IC 95%)
<b>Idade *</b>	16,5 ±10,0	12,4 ± 7,9	0,021 <sup>a</sup>	-----
<b>Gênero **</b>			0,429 <sup>b</sup>	0,7 (0,3 – 1,7)
Masculino	35 (64,8)	29 (72,5)		
Feminino	19 (35,2)	11 (27,5)		
<b>Desenvolvimento radicular **</b>			0,520 <sup>b</sup>	1,3 (0,5 – 3,4)
Ápice completo	41 (75,9)	28 (70,0)		
Ápice incompleto	13 (24,1)	12 (30,0)		
<b>Tempo extra-alveolar **</b>			0,003 <sup>b</sup>	3,7 (1,5 – 8,8)
Menos de 1 hora	33 (61,1)	12 (30,0)		
Mais de 1 hora	21 (38,9)	28 (70,0)		

\* média e desvio padrão; \*\* número e frequência; <sup>a</sup> Testes de Mann-Whitney;

<sup>b</sup> teste qui-quadrado de Pearson; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confiança.

**Tabela 2:** Relação entre nível de desenvolvimento radicular, tempo extra alveolar e a evolução do dente reimplantado após 1 ano de controle.

Rizogênese	Tempo extra alveolar	Reabsorção		Total	Valor de $p$
		Sem reabsorção	Com reabsorção/exodontia		
<b>Completa</b> (n=69)	- de 1 hora	24 (34,8)	7 (10,2)	31 (45,0)	0,007
	+ de 1 hora	17 (24,6)	21 (30,4)	38 (55,0)	0,447
<b>Incompleta</b> (n=25)	- de 1 hora	9 (36,0)	5 (20,0)	14 (56,0)	0,214
	+ de 1 hora	4 (16,0)	7 (28,0)	11 (44,0)	0,311

Valor de  $p$  com base no teste de diferença entre duas proporções.

**Tabela 3:** Meios de conservação do dente até a finalização do reimplante e sua evolução após 1 ano.

Meio de armazenamento	Sem reabsorção	Com reabsorção/exodontia	Total	Valor de $p$
Seco	17 <sup>a</sup> (40,5)	25 <sup>b</sup> (59,5)	42 (100,0)	0,020
Leite	9 <sup>a</sup> (64,3)	5 <sup>a</sup> (35,7)	14 (100,0)	
Soro	4 <sup>a</sup> (57,1)	3 <sup>a</sup> (42,9)	7 (100,0)	
Alvéolo	19 <sup>a</sup> (86,4)	3 <sup>b</sup> (13,6)	22 (100,0)	
Saliva	1 <sup>a</sup> (33,3)	2 <sup>a</sup> (66,7)	3 (100,0)	
Água	1 <sup>a</sup> (100,0)	0 <sup>a</sup> (0,0)	1 (100,0)	
Gelo	2 <sup>a</sup> (66,7)	1 <sup>a</sup> (33,3)	3 (100,0)	
Não relatado	1 <sup>a</sup> (50,0)	1 <sup>a</sup> (50,0)	2 (100,0)	
<b>Total*</b>	54 (57,4)	40 (42,6)	94 (100,0)	

\*Resultados em números absolutos e frequências. Cada letra diferente nas colunas demonstra diferença estatisticamente significativa nos valores de  $p$ . Teste do qui-quadrado.

**Tabela 4:** Análise genotípica dos tag SNPs no gene *IL4* para os modelos aditivo e recessivo para o alelo mais raro.

Tag SNP <sup>a</sup>	Variação [1/2] <sup>b</sup>	Modelo genético	Grupos	Genotipagem (%)			Univariada		
				Homozigoto 1	Heterozigoto	Homozigoto 2	Valor de <i>p</i> *	OR (IC 95%)	
rs2227284	[G/T]	Aditivo	Sem reabsorção	22 (41,5)	23 (43,4)	8 (15,1)	0,555		
			Com reabsorção/ exodontia	15 (67,5)	17 (27,5)	8 (5,0)			
		Recessivo	Sem reabsorção	22 (41,5)	31 (58,5)	0,696			1,2 (0,5 -2,7)
			Com reabsorção/ exodontia	15 (37,5)	25 (62,5)				
rs2243268	[A/C]	Aditivo	Sem reabsorção	33 (62,3)	18 (34,0)	2 (3,8)	0,737		
			Com reabsorção/ exodontia	27 (67,5)	11 (27,5)	2 (5,0)			
		Recessivo	Sem reabsorção	33 (62,3)	20 (37,7)	0,601			0,8 (0,3 -1,9)
			Com reabsorção/ exodontia	27 (67,5)	13 (32,5)				

<sup>a</sup> identificador de SNP baseado na NCBI dbSNP; <sup>b</sup> o primeiro alelo designa o comum o segundo o raro; \*Testes do qui-quadrado.

**Tabela 5:** Análise genotípica dos tag SNPs no gene *IL6* para os modelos aditivo e recessivo para o alelo mais raro.

Tag SNP <sup>a</sup>	Variação [1/2] <sup>b</sup>	Modelo genético	Grupos	Genotipagem (%)			Univariada	
				Homo- zigoto 1	Hetero- zigoto	Homo- zigoto 2	Valor de <i>p</i> *	OR (IC 95%)
rs1524107	[C/T]	Aditivo	Sem reabsorção	41 (75,9)	13 (24,1)	0 (0,0)	0,443	
			Com reabsorção/ exodontia	33 (82,5)	7 (17,5)	0 (0,0)		
rs2069835	[T/C]	Aditivo	Sem reabsorção	41 (83,7)	8 (16,3)	0 (0,0)	0,119	
			Com reabsorção/ exodontia	37(94,9)	2 (5,1)	0 (0,0)		
rs2069838	[C/T]	Aditivo	Sem reabsorção	52 (98,1)	1 (1,9)	0 (0,0)	0,537	
		Com reabsorção/ exodontia	39 (97,5)	0 (0,0)	1 (2,5)			
		Recessivo	Sem reabsorção	52 (98,1)	1 (1,9)	0 (0,0)	0,840	1,3 (0,1 - 22,9)
		Com reabsorção/ exodontia	39 (97,5)	1 (2,5)	0 (0,0)			
rs2069840	[C/G]	Aditivo	Sem reabsorção	28 (52,8)	23 (43,4)	2 (3,8)	0,356	
		Com reabsorção/ exodontia	18 (45,0)	19 (47,5)	3 (7,5)			
		Recessivo	Sem reabsorção	28 (52,8)	25 (47,2)	0 (0,0)	0,455	1,4 (0,6 - 3,1)
		Com reabsorção/ exodontia	18 (45,0)	22 (55,0)	0 (0,0)			
rs2069842	[G/A]	Aditivo	Sem reabsorção	52 (96,3)	2 (3,7)	0 (0,0)	0,999	
			Com reabsorção/ exodontia	40 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		
rs2069843	[G/A]	Aditivo	Sem reabsorção	44 (83,0)	6 (11,3)	3 (5,7)	0,085	
		Com reabsorção/ exodontia	38 (95,0)	2 (5,0)	0 (0,0)			
		Recessivo	Sem reabsorção	44 (83,0)	9 (17,0)	0 (0,0)	0,077	0,3 (0,1 -1,3)
		Com reabsorção/ exodontia	38 (95,0)	2 (5,0)	0 (0,0)			



rs2069845	[A/G]	Aditivo	Sem reabsorção	18 (37,5)	22 (45,8)	8 (16,7)	0,879		
			Com reabsorção/ exodontia	14 (35,9)	20 (51,3)	5 (12,8)			
		Recessivo	Sem reabsorção	18 (37,5)	30 (62,5)		0,877		1,1 (0,4 - 2,6)
			Com reabsorção/ exodontia	14 (35,9)	25 (64,1)				

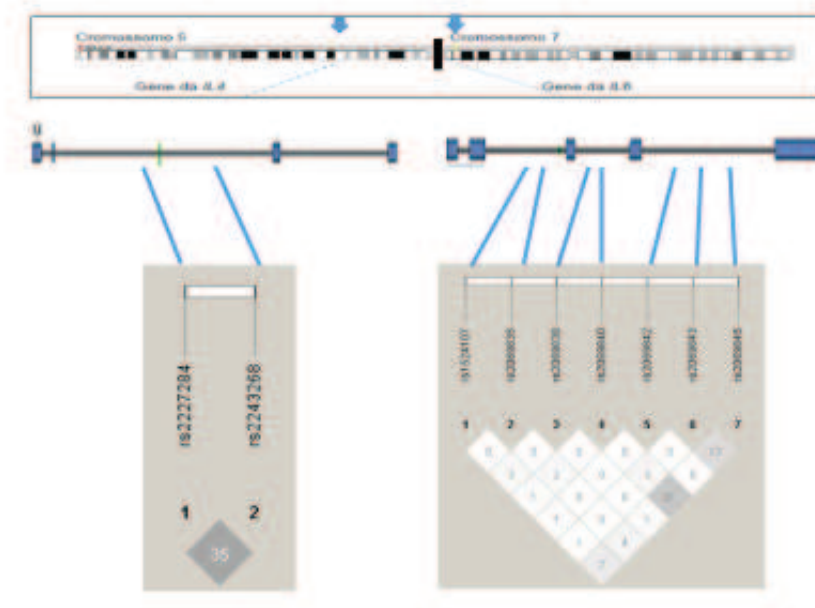
<sup>a</sup> rs identificador de SNP baseado na NCBI dbSNP; <sup>b</sup> o primeiro alelo designa o comum e o segundo, o raro; \*Testes do qui-quadrado; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confiança.

**Tabela 6:** Resultado da análise multivariada, modelo de regressão logística binária.

	Valor de $p^*$	OR	IC (95%)
<b>Tempo extra-alveolar &gt; 1 hora</b>	0,002	4,11	(1,7 - 10,1)
<b>rs2069843 no modelo aditivo IL6</b>	0,049	0,23	(0,1 – 1,0)

## FIGURA

**Figura 1:** Tag SNPs e análise de desequilíbrio de ligação dos genes *IL4* e *IL6*. Representação esquemática do desequilíbrio de ligação ( $r^2 < 0,8$ ) entre os dois tag SNPs do gene *IL4* e os sete tag SNPs do gene *IL6*.



**ARTIGO EM INGLÊS**

**ASSOCIATION ANALYSIS OF CLINICAL ASPECTS AND THE *IL4* AND *IL6*  
GENES POLYMORPHISMS IN THE OUTCOME OF AVULSED TEETH  
AFTER 1 YEAR OF REPLANTATION**

ROSKAMP L<sup>1</sup>, SOUZA CM<sup>1</sup>, TREVILATTO PC<sup>1</sup>, WESTPHALEN VPD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Health and Bioscience, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Correspondence: Vânia Portela Ditzel Westphalen. Endodontics Department, School of Health and Bioscience, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. R. Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho – Curitiba – Pr, Brasil CEP: 80242.980. phone number: 55.41.3271.2525, e-mail: [vania.westphalen@pucpr.br](mailto:vania.westphalen@pucpr.br)

**Running Title:**

*IL4* and *IL6* polymorphisms in root resorption

**Acknowledgements**

The authors deny any conflict of interest.

## ASSOCIATION ANALYSIS OF CLINICAL ASPECTS AND THE *IL4* AND *IL6* GENES POLYMORPHISMS IN THE OUTCOME OF AVULSED TEETH AFTER 1 YEAR OF REPLANTATION

### Abstract

**Aim:** Identification of factors involved in the initiation and progression of root resorption after tooth replantation demonstrates an important role of the host immune-inflammatory response. However, few studies investigating clinical, immunological and genetic characteristics exist in the literature. Thus, the aim of this study is to investigate the association of clinical variables and polymorphisms (tag SNPs) in the interleukin 4 (*IL4*) and interleukin 6 (*IL6*) genes, with the prognosis of avulsed and replanted teeth.

**Methodology:** Ninety-four patients who suffered avulsion and had their teeth replanted and endodontically treated were included in this study. Periapical radiographs were taken soon after tooth replantation and after 1 year follow-up. For genotypic *IL4* and *IL6* genes analysis, the DNA of the oral mucosa cells were collected. The *IL4* and *IL6* genes polymorphisms were performed by Real Time-PCR. Univariate and multivariate analyzes were performed to verify the association of clinical and genetic variables and the outcome of the replanted teeth ( $p < 0.05$ ).

**Results:** The univariate analysis was used to associate age, extra-alveolar time and the storage medium with root resorption. After multivariate analysis, the extra-alveolar time longer than one hour and the G allele of rs2069843 of the *IL6* gene were significantly associated with external root resorption.

**Conclusions:** Replanting the tooth in its socket immediately is the most important factor to maintain a healthy root surface. The extra-alveolar time of more than an hour and the G allele of the rs2069843 of the *IL6* gene were associated with the susceptibility to external root resorption.

**Keywords:** Cytokines. IL-4 gene. IL-6 gene. Root resorption. Single Nucleotide Polymorphism. Tag SNP. Tooth avulsion. Tooth replantation.

## Introduction

Dental traumatism is frequently observed in the clinical practice and it occurs in approximately 14% of children and adolescents (Andreasen & Andreasen 1989). Accidents during the sports practice, automobile, work and play can lead to facial trauma where the tooth and its supporting structure are often affected. These injuries have become a public health problem, causing aesthetic, psychological and social deficiencies (Moysés *et al.* 2008).

The severity of the injury depends on the energy and direction of the causative agent, as well as the strength of the supporting tissues and immunoinflammatory characteristics of the patient (Roskamp *et al.* 2009, Panzarini *et al.* 2013, Kramer *et al.* 2015). These traumas, if not properly treated, can lead to irreversible consequences, ending in the tooth loss (Flores *et al.* 2007a; Flores *et al.* 2007b, Andersson *et al.* 2012, Ritwik *et al.* 2015).

The most appropriate approach is the dental replantation, a procedure that aims to replace the tooth in its socket (Martins *et al.* 2004, Andersson *et al.* 2012). The root resorption is a major challenge after the tooth replantation. It happens mainly when a total or even a partial loss of the periodontal ligament occurs, especially when the optimum conditions for successful replantation is not presented. The resorption occurs in 57-80% of cases and can lead to the replanted tooth loss (Andersson 2007). The resorption of the tooth tissue and its substitution by bone is characteristic of the replacement root resorption. Besides, it may occur the inflammatory root resorption, that is related to the infected pulp tissue (Pohl *et al.* 2005).

Therefore, the functional and aesthetics significance of a replanted tooth, associated with young age of patients, has encouraged the search for more effective solutions, regarding the treatment to be performed and in the knowledge and prevention of likely causes of the external root resorption. It is vital to inform the patient or his guardian about what is possible to be done in cases of this injury and factors that affect the prognosis. The information such as: time elapsed between trauma and first treatment, storage medium before the dental replantation, intracanal medication, and possible signs and symptoms that may arise as a result of trauma and replantation must be very clear to the patient

(Blomlöf *et al.* 1983, von Büren *et al.* 2013, de Paula Reis *et al.* 2014). In the face of all these clinical events, it is concluded that the intensity of the inflammatory reaction triggered by the avulsion of the tooth and the penetration and proliferation of bacteria in the local microenvironment will determine the consequences on the affected tissue. Thus, the immune-inflammatory response of the host may have a fundamental importance in the maintenance of the tissue health (Roskamp *et al.* 2009, Roskamp *et al.* 2010, Roskamp *et al.* 2011, Romeo *et al.* 2014).

Playing an important role in the dental root resorption and periapical tissue breakdown are the interleukin 4 (IL-4) and interleukin 6 (IL-6). The cytokine IL-4 has an important impact in the anti-inflammatory reaction (Romeo *et al.* 2014). The cytokine IL-6 has a regulatory role in inflammatory processes and is considered an important pro-inflammatory cytokine (Araujo-Pires *et al.* 2014).

Expressed on the surface of the cell membrane of blasts cells are receptors that promote the contact necessary for the activation and deactivation of clast cells. RANK (receptor activator NF- $\kappa$ B), RANKL (receptor activator NF- $\kappa$ B ligand) and OPG (osteoprotegerin) have regulatory effects on the metabolism of hard tissues (Teng 2006). RANK, expressed at high levels in clastic precursors and clasts, is required for the activation and differentiation of clasts. RANKL is a transmembrane protein expressed on various cell types, particularly in activated T cells and blasts. RANKL induces cells to bind to clast precursors through its receptor RANK and initiates hard tissue resorption. OPG, expressed by blasts, inhibits the resorption process through its high affinity to the ligand RANKL, thus preventing the interaction RANK-RANKL. Proteins, cytokines and calciotropic hormones, which are important to the modulation of the immune response, regulate this process. The cells that express messenger RNA (mRNA) for RANKL, under stimulation with cytokines such as IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, promote inflammation and resorption. OPG, IL-4, IL-10 and CTLA-4 inhibit inflammation and clastogenesis (Teng 2006). Since the immune response is orchestrated by cytokines that are produced by the genetic code, it is important to investigate the genetic characteristics of the individual and his immune-inflammatory response contributing to the root resorption.



Thus, the study focused on polymorphic variations of the *IL4* and *IL6* genes. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), are the most common forms of variation in deoxyribonucleic acid (DNA) in the human genome. These genetic variants can affect the amount or function of the expressed protein, resulting in changes of both the innate and adaptive immune response, by determining the susceptibility or protection against some complex outcome (Laine *et al.* 2012, Gomes *et al.* 2013).

A modern genetic approach using SNPs in high linkage disequilibrium (LD) has been applied. This approach allows the researcher to genotype all polymorphisms in "targets" SNPs (tag SNP), structure that captures the entire gene information in terms of variability. This approach reduces costs and time in genotyping (Stram 2004).

Thus, this study aims to investigate the association of clinical variables and tag SNPs in *IL4* and *IL6* genes with the clinical outcome of avulsed and replanted teeth, in one-year period of clinical and radiographic control.

## **Materials and Methods**

### **Population study**

A sample of 94 patients (64 males and 30 females) who suffered avulsion and tooth replantation between 2004 and 2014 was included in this study. The patients had their teeth replanted with different ranges of extra-alveolar time and it was employed different storage media until replantation, according to recommendations by IADT (International Association of Dental Traumatology) (Flores *et al.* 2007b). The replanted teeth were divided into control group, which consisted of 54 teeth without resorption, and group case corresponding to 40 teeth presenting external root resorption or extracted after 1 year of clinical and radiographic control.

Objectives and procedures of this study were explained to all patients and an Informed Consent was signed. This work was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná – PUCPR, with the number of CEP 02320084000-10.

### **Inclusion criteria**

1. Patients of both genders, treated in the Dental Clinics of PUCPR, due to replantation caused by avulsion after dental trauma.
2. Replanted permanent teeth, controlled clinically and radiographically for a minimum of 1 year.
3. Patients with good oral hygiene.
4. Patients who have lost their replanted teeth only due to external root resorption.

### **Non-inclusion criteria**

1. Periodontal disease carriers.
2. Other soft or hard tissue diseases in the mouth.
3. Patients who were using continuous medication drugs.
4. Patients who were using or had used braces.
5. Patients immuno-compromised by autoimmune diseases, chemotherapy, infectious diseases, parasitic or immunodeficiency.
6. Smoking patients.
7. Pregnant or lactating.

The periapical radiographs of the replanted teeth were performed with the aid of radiographic positioners JON (São Paulo-SP, Brazil), soon next to replantation and after 1 year. Three endodontists, being two PhD and one master, evaluated the teeth, clinical and radiographically, with a very high concordance level. Radiographic signs such as: presence or absence of root resorption, complete presence, total or partial interruption of lamina dura, ankylosis, mobility, responses to horizontal and vertical percussion, presence or absence of spontaneous pain or pain on palpation were carefully recorded and evaluated.

Although the study sample was composed of Caucasoids, the white Brazilian population is heterogeneous. It is not recommended to Brazilians to be genetically separated based on ethnicity, color or geographical origin, because Brazilian individuals classified as black or white have overlapping genotypes, due to miscegenation (Parra *et al.* 2003).

### **Clinical variables**

The age and gender of the patient; development of the root, extra-alveolar time and storage medium of the avulsed tooth were analyzed in regards to the absence of root resorption or presence/extraction.

### **Collection and DNA purification**

The selected subjects rinsed for one minute with a glucose solution 3%. After rinsing, a sterile wooden spatula was used to scrape the buccal mucosa (Trevilatto & Line 2000). The tip of the spatula was then agitated in the rinsed solution. Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet suspended in 1300 µl of extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. Then 10 µl of proteinase K (20 mg/ml) was added to the solution and left overnight at 65°C. The DNA was purified by the addition of ammonium acetate 10 M, precipitated with isopropanol, ethanol 70% and suspended in 50 µl of Tris 10 mM (pH 7.6) and EDTA 1 mM (Aidar & Line 2007)

### **Analysis of the polymorphisms in the *IL4* and *IL6* genes**

The tag SNP markers, capturing all the information of the *IL4* and *IL6* genes were selected, according to the information available on the site International HapMap Project, phase III/Rel#2 (<http://www.hapmap.org>, 2014) (Thorisson *et al.* 2005).

The selection of the tag SNPs employed some criteria, such as population minimum allele frequency (MAF) of 5% and 80% cutoff ( $r^2 < 0.8$ ) to define the linkage disequilibrium (LD), in order to investigate the genes in details. For the *IL4* gene, the basis of population was the CEU population (Caucasian) and for the *IL6* was YRI (African). After applying the above criteria, two tag SNPs, capturing all information of the *IL4* gene were selected by the HapMap: reference SNP (rs) rs2227284 and 2243268. For *IL6*, eight tag SNPs were selected: rs1524107, rs2069835, rs2069837, rs2069838, rs2069840, rs2069842, rs2069843 and rs2069845.

The selected tag SNPs were genotyped by real time PCR, using the apparatus of Applied Biosystems 7500 (7500 Real-Time PCR System) with the TaqMan™ Technology Genotyping Master Mix (Applied Biosystems).

### **Statistical analysis**

To estimate the Hardy-Weinberg equilibrium and evaluate the linkage disequilibrium in the study population, the 4.2 Haploview software was employed. Statistical analyses were performed by 21.0 SPSS version. The non-parametric Mann-Whitney test was used to analyze quantitative variables. Categorical variables were analyzed by chi-square test or Fisher's exact test. *P* values  $< 0.05$  were considered significant. For the multivariate analysis, the binary logistic regression model was fitted to analyze the genotype frequencies, including the variables with significance set at  $p < 0.20$ .

## Results

### Clinical and environmental characteristics

The age of the patients who had their teeth evaluated ranged from 5 to 50 years old. The mean age was 14 years old and the median was 11 years old. Seventy-five patients (79.8%) were under 18 years old. They suffered more resorption / extraction than the patients older than 18 years ( $p=0.021$ ) (Table 1).

The males suffered more avulsion and replantation than females, but no statistically significant difference in the presence or absence of external root resorption was demonstrated ( $p=0.429$ ) (Table 1).

Of the 94 patients, 54 (57.4%) remained without resorption, 26 presented external root resorption (27.7%) and 14 (14.9%) teeth were extracted after 1 year of replantation.

Of the 94 patients, 69 (73.4%) had teeth with complete root formation. There was no statistically significant difference between the groups with and without resorption / extraction at the development of the root at the time of replantation ( $p=0.520$ ) (Table 1). Of the 69 replanted teeth with complete root formation, 41 (59.4%) remained without resorption and 28 (40.6%) had resorption or were extracted. Of the 31 (45.0%) teeth replanted within one hour, 24 teeth (34.8%), did not present external root resorption and 7 (10.2%) did, demonstrating an statistically significant difference ( $p=0.007$ ) (Table 2). Of the 25 teeth with open apices, 13 (52.0%) remained without resorption and 12 (48.0%) had resorption or were extracted. Of the 25 immature permanent teeth, 14 were replanted in less than an hour, 9 (64.3%) showed no resorption and 5 (35.7%) exhibited resorption (Table 2). Of the nine teeth without resorption, 4 (44.4%) suffered pulp revascularization. Of the 11 teeth with open apices that were replanted after 1 hour, 4 (36.4%) showed no resorption, 5 (45.4%) suffered external root resorption and 2 (18.2%) teeth were extracted.

Of the 94 patients, 45 (47.9%) were replanted in less than one hour of extra-alveolar time. Out of the teeth that were stored in suitable media (alveoli and milk), as recommended by IADT, 22 (48.9%) were immediately replanted in their sockets, and 3 (6.7%) remained in milk. Of the other teeth that were stored in inappropriate media, 10 (22.2%) were stored dry, 2 (4.4%) in saline, 3 (6.7%)

in saliva, 1 (2.2%) in water, 3 (6.7%) on ice, and 1 (2.2%) in an unknown environment until their replantation. Thirty-three (73.4%) teeth remained without external root resorption and 11 (24.4%) teeth presented root resorption. Only 1 (2.2%) patient, who had his tooth kept in saline solution for less than 1 hour, had his tooth extracted.

Forty-nine (52.1%) teeth were replanted after one hour. Of these, 11 (22.5%) were kept in milk until replantation. Of the 38 (77.5%) teeth, 32 (65.3%) were stored dry, 5 (10.2%) in saline solution, and 1 (2.0%) in unknown medium. Of the 49 patients, 21 (42.9%) had no external root resorption, 15 (30.6%) had resorption, and 13 (26.5%) teeth were extracted.

There was a statistically significant difference for the storage media until replantation ( $p=0.020$ ). The alveolus was significantly associated with the success of replantation: 22 teeth that were placed in the socket until the completion of the replantation, 19 (86.4%) remained without resorption and 3 (13.6%) had resorption. Moreover, the tooth stored dry, showed to be significantly associated with resorption / extraction: of the 42 teeth, 17 (40.5%) had no resorption and 25 (59.5%) presented resorption / extraction after 1 year (Table 3).

Most important, teeth replanted within 1 hour showed less external root resorption ( $p=0.003$ ) than those of more than 1 hour of extra-alveolar time (Table 1).

### **Genetic analysis**

The distribution of genotype frequencies for the polymorphisms are presented in tables 4 and 5. The genotype frequencies of the tested tag SNPs are in Hardy-Weinberg equilibrium for the control group. The analysis of linkage disequilibrium between markers confirmed independence among them ( $r^2<0.8$ ). Figure 1 shows the linkage disequilibrium map for *IL4* and *IL6* genes.

Only one tag SNP, rs2069837 of the *IL6* gene, did not work in genotyping. There was no statistically significant difference between the groups with and without root resorption / extraction for any of the tag SNPs in *IL4* and *IL6* genes. It was found a borderline result in the additive model for rs2069843 of *IL6* gene ( $p=0.085$ ) and in the dominant model for the G allele of the same polymorphism

( $p=0.077$ ) (Tables 4 and 5). Indeed, the teeth replanted in ideal conditions (extra-alveolar time of less than one hour and in a suitable storage medium), that presented the genotype G/G in rs2069843 of *IL6* gene, showed root resorption / extraction.

### **Multivariate analysis**

Among all the variables that were selected to compose the multivariate analysis (variables with  $p<0.200$ ), only the extra-alveolar time ( $p<0.002$ ) and rs2069843 in the additive model of *IL6* gene ( $p<0.049$ ) demonstrated association with root resorption / extraction (Table 6). Indeed, the multivariate analysis showed that teeth that were replanted in less than one hour presented 4.11 times better outcomes than the ones replanted after one hour of extra-alveolar time [ $p=0.002$  (1.7-10.1)].

## Discussion

The literature lacks studies investigating the association between genetic polymorphisms and root resorption in avulsed and replanted teeth. In this study, for the first time, it was employed an approach that analyzed the *IL4* and *IL6* genes completely, in a sample of 94 replanted teeth.

The periapical radiographs are still the best way for clinical cost/benefit ratio for the investigation of root resorption (Bernardes *et al.* 2012). However, it has drawbacks, such as two-dimensional image into a three-dimensional structure. Thus, clinical controls and frequently tooth radiographs are required over time. The use of cone beam (CBCT) technique can be of great value, particularly because of its ability to demonstrate the tooth in three dimensions, facilitating the detection of root resorption still in its beginning and in later comparisons (Bernardes *et al.* 2012). Unfortunately, besides the increased radiation to the patient and inferior image resolution, this technique still does not provide a satisfactory cost/benefit for most dental clinics, being far from the everyday reality of most dentists. Anyway, while CBCT imaging can enhance the trauma diagnosis, the value of, a complete clinical and radiographic examination remains valid for an effective diagnosis of a traumatized tooth (Andreasen & Kahler, 2015).

The patients in this study were mostly younger than 18 years old. According to the literature, younger patients suffer more dental avulsion than adults (Nguyen *et al.* 2004, Fariniuk *et al.* 2010). In addition, in this study, younger patients, mean age of 12 years old, had more root resorption / extraction than older patients did. One can suppose that patients in a growing up stage have a more intense metabolism, leading to a more important dental or bone resorption.

Regarding the gender of the patients, male suffered more tooth replantation [64 (71.1%) teeth] than female [30 (31.9%) teeth] ( Fariniuk *et al.* 2010). However, it did not cause a statistically significant difference between genders for the presence or absence of root resorption (Ritwik *et al.* 2015).

As Tsilingaridis *et al.* pointed out, there was no significant difference in the presence or absence of resorption in teeth with complete or incomplete root formation after one year of clinical and radiographic control (Tsilingaridis *et al.*



2015). Our results differ from those by Petrovic *et al.* (2010). In their study, immature incisors exhibited more complications compared with mature teeth (Petrovic *et al.* 2010). Their study evaluated the results of replantation of teeth stored in a dry environment. The dry storage medium may have been the deciding factor in the difference between these two results. However, in this study, teeth with closed apices demonstrated statistically significant better results when replanted within one hour, as also demonstrated by Petrovic *et al.* (Petrovic *et al.* 2010). Indeed, the extra-alveolar time of less than an hour was determinant for the revascularization of the avulsed tooth. Of the 13 teeth with incomplete root formation that did not undergo resorption, 4 (30.8%) teeth, which had extra-alveolar time less than one hour, suffered pulp revascularization, with no need of any endodontic therapy. On the other hand, no tooth with open apex, which remained out of its socket over than an hour, underwent revascularization. The importance of extra-alveolar time of less than an hour is pointed as ideal in the dental avulsion guidelines for teeth with open apices, published by IADT (Flores *et al.* 2007b, Andersson *et al.* 2012).

Our results confirmed that teeth that were replanted in less than one hour really show better outcomes (OR: 4.11) than the ones replanted after one hour of extra-alveolar time. In this study, of the 45 teeth that were replanted in less than an hour, only 1 (2.2%) tooth was extracted after 1 year of follow-up. This successful result coincides with the measures taken in case of immediate replantation, as the scientific community suggests (Flores *et al.* 2007b, Andersson *et al.* 2012).

There was a statistically significant success for teeth that were quickly replanted, resulting in lower presence of resorption / extraction. The dry medium presented the worst prognosis, with the highest rate of resorption / extraction. These results are in agreement with other authors (Andreasen *et al.* 1995, Sonoda *et al.* 2008, Panzarini *et al.* 2013). On the other hand, replanting the tooth in its socket was the most successful procedure for the avulsed tooth, since the status of the periodontal ligament is critical for the healing of replanted teeth (Zhao *et al.* 2013).

The high percentages of root resorption / extraction obtained in this study, when the tooth remained out of its socket for more than 1 hour, suggest the need

to modify the late replantation technique. To achieve a better performance in late replantation, the development of products and techniques that maintain or regain the viability of the periodontal ligament has been the focus of several authors (Macway-Gomez & Lallier 2013, Zhao *et al.* 2013, Tuna *et al.* 2015, Subramaniam *et al.* 2015).

Genetic factors that predispose to the hard tissue resorption have been investigated in the fields of orthodontics, periodontics and endodontics (Al-Qawasmi *et al.* 2003, Bastos Lages *et al.* 2009, Nibali *et al.* 2010, Fontana *et al.* 2012, Bastos *et al.* 2015). Although the literature provides genetic association studies with the external apical root resorption (EARR) in orthodontically treated teeth, it is believed that these studies should not serve as a direct basis for comparison to what occurs with the avulsed and replanted tooth, due to the characteristics of the resorption. In orthodontics, the EARR is self-limiting, i.e., the resorptive process stops upon removal of the orthodontic force (Fuss *et al.* 2003). Furthermore, there is no involvement of bacteria, which could lead to the intensification of the immune-inflammatory response. In cases of replantation, the replacement resorption is continuous and may induce the tooth loss. The dental tissue is replaced, as part of the bone metabolism, with discontinuity of the lamina dura. The combination of the presence of bacteria, with the cementum layer damage, may also lead to an inflammatory root resorption. In these cases, the destruction of the root and surrounding bone tissue and the presence of a granulation tissue originated by the local inflammatory reaction takes place (Finucane & Kinirons 2003, Lin *et al.* 2013).

There are several studies investigating the association between genetic polymorphisms of IL-1 and EARR (Al-Qawasmi *et al.* 2003, Bastos Lages *et al.* 2009, Fontana *et al.* 2012). However, this association was not established in the apical periodontitis repair, where the participation of bacteria as an additional stimulus to the immune-inflammatory response occurs (Siqueira *et al.* 2009). Thus, even with possible specificities, it is believed that the resorption that happens after dental replantation is more similar to the one of apical periodontitis and periodontal disease than to that observed in orthodontic treatment.

Previous studies demonstrated that a balance between pro and anti-inflammatory mediators determine the stability or progression of periapical

lesions, by modulation of the receptor activator of NFkB ligand (RANKL), receptor activator of NFkB (RANK), and its receptor antagonist, osteoprotegerin (OPG) (Xie *et al.* 2014, Armada *et al.* 2015). However, the cytokine network that operates in the mechanism of hard tissue resorption, especially in the tooth root, is more complex than the simple paradigm of the pro and anti-inflammatory mediators suggested (Cavalla *et al.* 2014).

Interleukin-4 is one of the anti-inflammatory cytokine that has an important role in allergic diseases by its ability to initiate, maintain and increase T helper 2 lymphocyte responses (Th2) (Romeo *et al.* 2014). Its main function is to stimulate the production of immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin G (IgG). It acts on the mast cells and basophils that, when activated, produce more IL-4 and IL-13. As a typical cytokine of immune Th2 profile, it acts as a protective mediator of hard tissue resorption because of its ability to increase OPG levels and inhibit RANKL. It suppresses pro-inflammatory of the type T helper 1 (Th1) response, decreasing macrophage action (Anovazzi *et al.* 2013). The regulatory T cells (Tregs) and Th2 cytokines such as IL-4 are associated with the attenuation of periodontal disease (Araujo-Pires *et al.* 2015) and inactivity of periapical lesions (Araujo-Pires *et al.* 2014).

The *IL4* gene is located on the long arm of chromosome 5 in the 5q31.1 region along with other genes of Th2 cytokines (Yan *et al.* 2014). Several studies involving polymorphisms of this cytokine have been conducted to assess their role in the destruction of bone tissue. Authors report that *IL4* gene polymorphisms are not associated with periodontal disease (Scarel-Caminaga *et al.* 2003, Anovazzi *et al.* 2013). However, a meta-analysis of genetic polymorphisms -590C/T and -33C/T of the *IL4* gene and susceptibility to periodontitis suggested that the TT genotype and T allele of the -590C/T are associated with increased risk for periodontitis in Caucasian individuals but not the -33C/T polymorphism (Yan *et al.* 2014).

IL-6 is a pleiotropic cytokine synthesized by many cell types, including monocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes and lymphocytes (Azuma *et al.* 2014). It can be considered a pro and anti-inflammatory cytokine, produced by stimuli such as trauma and infection. It stimulates the activation of T-cells, the differentiation of B lymphocytes and the

antibody production. It promotes the acute phase proteins production, the hematopoiesis and the induction of angiogenesis. Acting as a pro-inflammatory cytokine, it activates osteoclasts, promoting bone resorption in the presence of infections (Azuma *et al.* 2014). It is one of the acute phase proteins most studied. It was suggested as an inflammatory marker of periodontitis (Keles *et al.* 2014) and of chronic apical lesions (Abdolsamadi *et al.* 2008).

The *IL6* gene is located on the short arm of the chromosome 7 in the region 7p21.1. The polymorphisms of the *IL6* gene affect circulating IL-6 levels. The variation G>C in position -174 has been found to influence the production and expression of this cytokine (Laine *et al.* 2010). The C allele revealed change in the gene transcription in response to stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) and IL-1 (Fishman *et al.* 1998). There was a significant association between allele G or GG genotype for the polymorphism -174 (G/C) of the *IL6* gene and its presence in acute dental abscesses (Sá *et al.* 2007). Regarding chronic periodontitis, it has also been suggested that the -174 polymorphism (GG genotype) is related to its pathogenesis (Trevilatto *et al.* 2003).

In this study, there was a borderline result for the rs2069843 (allele G) of the *IL6* gene in the analysis between groups without resorption and with resorption / extraction. This result may indicate an association trend with root resorption in the population studied, in the presence of clinical variables, such as age, extra-alveolar time and storage medium. In a study with patients with class II, division 1 malocclusion orthodontically treated, there was a significant association between rs2069843 and EARR (Reichow 2012). It was related also with signs, symptoms and the quality of life of patients with lung cancer (Rausch *et al.* 2010), and with the birth of smaller babies than expected for gestational age in European and African American women (Harmon *et al.* 2014), demonstrating its role not only in the metabolism of hard tissues. Actually, all the teeth replanted in ideal conditions (less than one hour of extra-alveolar time or/and kept in a suitable medium), which presented external root resorption or were extracted after one year of follow up, belonged to individuals presenting GG genotype for rs 2069843 in *IL6* gene.

However, the interpretation of the results of this study must be treated sparingly, because it is a complex and probably a polygenic condition in which

strong interference of the handling and treatment of replanted tooth along with a genetic modulation can coexist. In fact, it is not always possible to establish a direct relationship between phenotype and genotype, due to the influence of different environmental factors such as: the extra-alveolar time, the storage medium and the time elapses until the first cleaning and shaping of the root canal. In addition, this study has limitations: the population-based sample is small. However, tooth avulsion occurs approximately in 1 to 11% of all teeth injuries, and the tooth is not always replanted. Possibly a larger sample size would reduce the standard error of the mean, tending to validate the results of statistically significant differences. Therefore, as with all epidemiological studies of genetic association, replication of these results in independent population samples becomes mandatory.

## **Conclusion**

The extra-alveolar time less than one hour was critical to maintaining the health of the replanted tooth. The immediate replacement of the tooth in its socket remains the best choice for dental avulsion. The G allele of rs2069843 of the *IL6* gene was associated with susceptibility to external root resorption in replanted teeth.

## **Acknowledgements**

The authors deny any conflict of interest.

## References

- Abdolsamadi HR, Vahedi M, Esmaeili F, Nazari S, Abdollahzadeh S (2008) Serum Interleukin-6 as a Serologic Marker of Chronic Periapical Lesions: A Case-control Study. *Journal of Dental Research Dental Clinics and Dental Prospects* **2**,43–7.
- Aidar M, Line SRP (2007) A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian Dental Journal* **18**,148–152.
- Al-Qawasmi R, Hartsfield JK, Everett ET, *et al.* (2003) Genetic predisposition to external apical root resorption. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **123**,242–52.
- Andersson L (2007) Tooth avulsion and replantation: Editorial. *Dental Traumatology* **23**,129.
- Andersson L, Andreasen JO, Day P, *et al.* (2012) International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dental Traumatology* **28**,88–96.
- Andreasen FM, Kahler B (2015) Diagnosis of acute dental trauma: the importance of standardized documentation: a review. *Dental Traumatology* **31**,340–9.
- Andreasen J, Andreasen F (1989) Dental trauma: quo vadis. *Tandlaegebladet* **93**,381–4.
- Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM (1995) Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endodontic and Dental Traumatology* **11**,76–89.
- Anovazzi G, Finoti LS, Corbi SCT, *et al.* (2013) Interleukin 4 haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis are associated with IL-4 protein levels but not with clinical outcomes of periodontal therapy. *Human Immunology* **74**,1688–95.
- Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, *et al.* (2014) Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science* **22**,336–46.
- Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, *et al.* (2015) IL-4/CCL22/CCR4 Axis Controls Regulatory T-Cell Migration That Suppresses Inflammatory Bone Loss in Murine Experimental Periodontitis. *Journal of Bone and Mineral Research* **30**,412–22.
- Armada L, Marotta PS, Pires FR, Siqueira JF (2015) Expression and

- Distribution of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand, and Osteoprotegerin in Periradicular Cysts. *Journal of Endodontics* **41**,1281–7.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA (2014) The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *International Endodontic Journal* **47**,615–21.
- Bastos JV, Côrtes MIS, Silva JFC, *et al.* (2015) A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *International Endodontic Journal* **48**,878–87.
- Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, *et al.* (2009) Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **136**,542–6.
- Bernardes RA, Paulo RS, Pereira LO, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Azevedo JR (2012) Comparative study of cone beam computed tomography and intraoral periapical radiographs in diagnosis of lingual-simulated external root resorptions. *Dental Traumatology* **28**,268–72.
- Blomlöf L, Lindskog S, Andersson L, Hedström KG, Hammarström L (1983) Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *Journal of Dental Research* **62**,912–6.
- Büren A, Krastl G, Kühn S, Filippi A (2013) Management of avulsions in Switzerland 2007-2010. *Dental Traumatology* **30**,176–81.
- Cavalla F, Araujo-Pires AC, Bigueti CC, Garlet GP (2014) Cytokine Networks Regulating Inflammation and Immune Defense in the Oral Cavity. *Current Oral Health Reports* **1**,104–13.
- Fariniuk LF, Souza MH, Westphalen VPD, *et al.* (2010) Evaluation of care of dentoalveolar trauma. *Journal of Applied Oral Science* **18**,343–5.
- Finucane D, Kinirons MJ (2003) External inflammatory and replacement resorption of luxated, and avulsed replanted permanent incisors: a review and case presentation. *Dental Traumatology* **19**,170–4.
- Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, *et al.* (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **102**,1369–76.
- Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, *et al.* (2007)(a) Guidelines for the management of traumatic dental injuries. I. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dental Traumatology* **23**,66–71.



Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, *et al.* (2007)(b) Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dental Traumatology* **23**,130–6.

Fontana MLSSN, Souza CM, Bernardino JF, *et al.* (2012) Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **142**,339–47.

Fuss Z, Tsesis I, Lin S (2003) Root resorption - diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dental Traumatology* **19**,175–82.

Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, *et al.* (2013) Can Apical Periodontitis Modify Systemic Levels of Inflammatory Markers? A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Endodontics* **39**,1205–17.

Harmon QE, Engel SM, Wu MC, *et al.* (2014) Polymorphisms in Inflammatory Genes are Associated with Term Small for Gestational Age and Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* **71**,472–84.

Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G (2014) Analysis of YKL-40 Acute-Phase Protein and Interleukin-6 Levels in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* **85**,1240–6.

Kramer PF, Feldens EG, Bruch CM, Ferreira SH, Feldens CA (2015) Clarifying the effect of behavioral and clinical factors on traumatic dental injuries in childhood: a hierarchical approach. *Dental Traumatology* **31**,177–83.

Laine ML, Loos BG, Crielaard W (2010) Gene Polymorphisms in Chronic Periodontitis. *International Journal of Dentistry* **2010**,1–22.

Macway-Gomez S, Lallier TE (2013) Pedialyte promotes periodontal ligament cell survival and motility. *Journal of Endodontics* **39**,202–7.

Martins WD, Westphalen VPD, Westphalen FH (2004) Tooth replantation after traumatic avulsion: a 27-year follow up. *Dental Traumatology* **20**,101–5.

Moysés SJST, Camilotti AG, Vetorello M (2008) Spatial analysis of dental trauma in 12-year-old schoolchildren in Curitiba, Brazil. *Dental Traumatology* **24**,449–53.

Nguyen PMT, Kenny DJ, Barrett EJ (2004) Socio-economic burden of permanent incisor replantation on children and parents. *Dental Traumatology* **20**,123–33.

Nibali L, Donos N, Farrell S, *et al.* (2010) Association between interleukin-6 - 174 polymorphism and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**,1814–9.

Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, *et al.* (2013) Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dental Traumatology* **29**,15–22.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **100**,177–82.

Paula Reis MV, Moura CCG, Soares PBF, *et al.* (2014) Histologic and Micro-Computed Tomographic Analyses of Replanted Teeth Stored in Different Kind of Media. *Journal of Endodontics* **40**,665–9.

Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D (2010) Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dental Traumatology* **26**,52–9.

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H (2005) Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Endodontic considerations. *Dental Traumatology* **21**,80–92.

Rausch SM, Clark MM, Patten C, Liu H, Felten S, Li Y, *et al.* (2010) Relationship between cytokine gene single nucleotide polymorphisms and symptom burden and quality of life in lung cancer survivors. *Cancer* **116**,4103–13.

Reichow A M (2012) Análise da associação entre aspectos clínicos e polimorfismos no gene da IL-6 e a susceptibilidade à perda de mini-implantes para ancoragem ortodôntica (PhD Thesis). Curitiba, Brazil: Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ritwik P, Massey C, Hagan J (2015) Epidemiology and outcomes of dental trauma cases from an urban pediatric emergency department. *Dental Traumatology* **31**,97–102.

Romeo MJ, Agrawal R, Pomés A, Woodfolk JA (2014). A molecular perspective on TH2-promoting cytokine receptors in patients with allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**,952–60.

Roskamp L, Westphalen VD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX, Westphalen FH (2010) Relationship between extra-alveolar time and atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *Journal of Trauma* **69**,E79–81.

Roskamp L, Westphalen VPD, Carneiro E, Fariniuk LF, Silva Neto UX (2011) The positive influence of atopy on the prognosis of avulsed and replanted teeth despite differences in post-trauma management. *Journal of Endodontics* **37**,463–5.

Roskamp L, Westphalen VPD, Lima JHC, *et al.* (2009) The influence of atopy in the prognosis of the replantation of avulsed teeth. *Journal of Periodontology*

80,1121–4.

Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, *et al.* (2007) Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *International Endodontic Journal* **40**,563–72.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Line SRP (2003) Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* **30**,341–5.

Siqueira JF, Rôças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, Lima KC (2009) Relationship Between Fcγ Receptor and Interleukin-1 Gene Polymorphisms and Post-treatment Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics* **35**,1186–92.

Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sottovia AD, Okamoto T (2008) Tooth replantation after keeping the avulsed tooth in oral environment: Case report of a 3-year follow-up. *Dental Traumatology* **24**,373–6.

Stram DO (2004) Tag SNP selection for association studies. *Genetic Epidemiology* **27**,365–74.

Subramaniam P, Girija P, Eswara U, Girish Babu KL (2015) Oral rehydration salt-liquid as a storage medium for avulsed tooth. *Dental Traumatology* **31**,62–6.

Teng Y-T (2006) Protective and Destructive Immunity in the Periodontium: Part 2--T-cell-mediated Immunity in the Periodontium. *Journal of Dental Research* **85**,209–19.

Thorisson GA, Smith A V, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Research* **15**,1592–3.

Trevilatto PC, Line SR (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Journal of Forensic Odontostomatology* **18**,6–9.

Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, de Brito RB, de Souza AP, Line SRP (2003) Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. *Journal of Clinical Periodontology* **30**,438–42.

Tsilingaridis G, Malmgren B, Skutberg C, Malmgren O (2015) The effect of topical treatment with doxycycline compared to saline on 66 avulsed permanent teeth - a retrospective case-control study. *Dental Traumatology* **31**,171–6.

Tuna EB, Arai K, Tekkesin MS, *et al.* (2015) Effect of fibroblast growth factor and enamel matrix derivative treatment on root resorption after delayed replantation. *Dental Traumatology* **31**,49–56.

Xie X, Ma S, Li C, *et al.* (2014) Expression of Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs) in the reparative dentin of rat molars. *Dental Traumatology* **30**,285–95.

Yan Y, Weng H, Shen Z-H, Wu L, Zeng X-T (2014) Association between interleukin-4 gene -590 c/t, -33 c/t, and 70-base-pair polymorphisms and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Journal of Periodontology* **85**,e354–62.

Zhao Y-H, Zhang M, Liu N-X, *et al.* (2013) The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials* **34**,5506–20.

## TABLES

**Table 1.** Baseline characteristics of the study population.

	Without resorption (n=54; 57.45)	With Resorption/ tooth loss (n=40; 42.55)	p-Value	OR (CI 95%)
<b>Age *</b>	16.5 ±10.0	12.4 ± 7.9	0.021 <sup>a</sup>	—
<b>Gender **</b>				
<b>Male</b>	35 (64.8)	29 (72.5)		
<b>Female</b>	19 (35.2)	11 (27.5)	0.429 <sup>b</sup>	0.7 (0.3 – 1.7)
<b>Root development **</b>				
<b>closed apex</b>	41 (75.9)	28 (70.0)		
<b>open apex</b>	13 (24.1)	12 (30.0)	0.520 <sup>b</sup>	1.3 (0.5 – 3.4)
<b>Extra-alveolar time **</b>				
<b>Less than 1 hour</b>	33 (61.1)	12 (30.0)		
<b>More than 1 hour</b>	21 (38.9)	28 (70.0)	0.003 <sup>b</sup>	3.7 (1.5 – 8.7)

\* Media and Standard Deviation; \*\* Noun and Frequency; <sup>a</sup> Mann-Whitney Test;

<sup>b</sup> Pearson Chi-Square; OR. Odds Ratio; IC. Confidence Interval.

**Table 2:** Relationship between the root apex, extra-alveolar time and the outcome of the replanted teeth after 1 year of follow up.

Root development	Extra-alveolar time	Resorption		Total	p-Value
		without resorption	with resorption/extaction		
<b>closed apex</b> (n=69)	< than 1 hour	24 (34.8)	7 (10.2)	31 (45.0)	0.007
	> than 1 hour	17 (24.6)	21 (30.4)	38 (55,0)	0.447
<b>open apex</b> (n=25)	< than 1 hour	9 (36.0)	5 (20.0)	14 (56.0)	0.214
	> than 1 hour	4 (16.0)	7 (28.0)	11 (44.0)	0.311

**Table 3:** Storage media of the avulsed tooth until the end of the replantation procedures.

Storage media	Without resorption	With resorption/ extraction	Total	<i>p</i> -Value
<b>Dry</b>	17 <sub>a</sub> (40.5)	25 <sub>b</sub> (59.5)	42 (100.0)	0.02
<b>Milk</b>	9 <sub>a</sub> (64.3)	5 <sub>a</sub> (35.7)	14 (100.0)	
<b>Saline solution</b>	4 <sub>a</sub> (57.1)	3 <sub>a</sub> (42.9)	7 (100.0)	
<b>Socket</b>	19 <sub>a</sub> (86.4)	3 <sub>b</sub> (13.6)	22 (100.0)	
<b>Saliva</b>	1 <sub>a</sub> (33.3)	2 <sub>a</sub> (66.7)	3 (100.0)	
<b>Water</b>	1 <sub>a</sub> (100.0)	0 <sub>a</sub> (0.0)	1 (100.0)	
<b>Ice</b>	2 <sub>a</sub> (66.7)	1 <sub>a</sub> (33.3)	3 (100.0)	
<b>Unknown</b>	1 <sub>a</sub> (50.0)	1 <sub>a</sub> (50.0)	2 (100.0)	
<b>Total</b>	54 (57.4)	40 (42.6)	94 (100.0)	

Each equal subscript letter denotes a subset of without resorption or with resorption / extraction groups whose column proportions do not differ significantly from each other at the .05 level.

**Table 4:** Genotype analysis of *IL4* gene tag SNPs in additive and recessive models for the most uncommon alleles.

Tag SNP <sup>a</sup>	Variation [1/2] <sup>b</sup>	Genetic Model	Groups	Genotype (%)			Univariate			
				Homozygous1	Heterozygous	Homozygous 2	P- <sup>*</sup> Value	OR (CI 95%)		
rs2227284	[G/T]	Additive	Without resorption	22 (41.5)	23 (43.4)	8 (15.1)	0.555			
			With resorption / extraction	15 (67.5)	17 (27.5)	8 (5.0)				
		Recessive	Without resorption	22 (41.5)	31 (58.5)				0.696	1.2 (0.5 - 2.7)
			With resorption / extraction	15 (37.5)	25 (62.5)					
rs2243268	[A/C]	Additive	Without resorption	33 (62.3)	18 (34.0)	2 (3.8)	0.737			
			With resorption / extraction	27 (67.5)	11 (27.5)	2 (5.0)				
		Recessive	Without resorption	33 (62.3)	20 (37.7)				0.601	0.8 (0.3 - 1.9)
			With resorption / extraction	27 (67.5)	13 (32.5)					

<sup>a</sup> identification of SNP based in NCBI dbSNP; <sup>b</sup> the first letter indicates the common allele and the second is the most uncommon; \* Pearson Chi-Square Test.



**Table 5:** Genotype analysis of *IL6* gene tag SNPs in additive and recessive models for the most uncommon alleles.

Tag SNP <sup>a</sup>	Variation [1/2] <sup>b</sup>	Genetic Model	Groups	Genotype (%)			Univariate			
				Homozygous1	Heterozygous	Homozigoto 2	p-Value*	OR (CI 95%)		
rs1524107	[C/T]	Additive	Without resorption	41 (75.9)	13 (24.1)	0 (0.0)	0.443			
			With resorption/ extraction	33 (82.5)	7 (17.5)	0 (0.0)				
rs2069835	[T/C]	Additive	Without resorption	41 (83.7)	8 (16.3)	0 (0.0)	0.119			
			With resorption/ extraction	37(94.9)	2 (5.1)	0 (0.0)				
rs2069838	[C/T]	Additive	Without resorption	52 (98.1)	1 (1.9)	0 (0.0)	0.537			
			With resorption/ extraction	39 (97.5)	0 (0.0)	1 (2.5)				
		Recessive	Without resorption	52 (98.1)	1 (1.9)				0.840	1.3 (0.1 - 22.9)
			With resorption/ extraction	39 (97.5)	1 (2.5)					
rs2069840	[C/G]	Additive	Without resorption	28 (52.8)	23 (43.4)	2 (3.8)	0.356			
			With resorption/ extraction	18 (45.0)	19 (47.5)	3 (7.5)				
		Recessive	Without resorption	28 (52.8)	25 (47.2)				0.455	1.4 (0.6- 3.1)
			With resorption/ extraction	18 (45.0)	22 (55.0)					
rs2069842	[G/A]	Additive	Without resorption	52 (96.3)	2 (3.7)	0 (0.0)	0.999			
			With resorption/ extraction	40 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
rs2069843	[G/A]	Additive	Without resorption	44 (83.0)	6 (11.3)	3 (5.7)	0.085			
			With resorption/ extraction	38 (95.0)	2 (5.0)	0 (0.0)				
		Recessive	Without resorption	44 (83.0)	9 (17.0)				0.077	0.3 (0.1- 1.3)
			With resorption/ extraction	38 (95.0)	2 (5.0)					
rs2069845	[A/G]	Additive	Without resorption	18 (37.5)	22 (45.8)	8 (16.7)	0.879			
			With resorption/ extraction	14 (35.9)	20 (51.3)	5 (12.8)				
		Recessive	Without resorption	18 (37.5)	30 (62.5)				0.877	1.1 (0.4- 2.6)
			With resorption/ extraction	14 (35.9)	25 (64.1)					

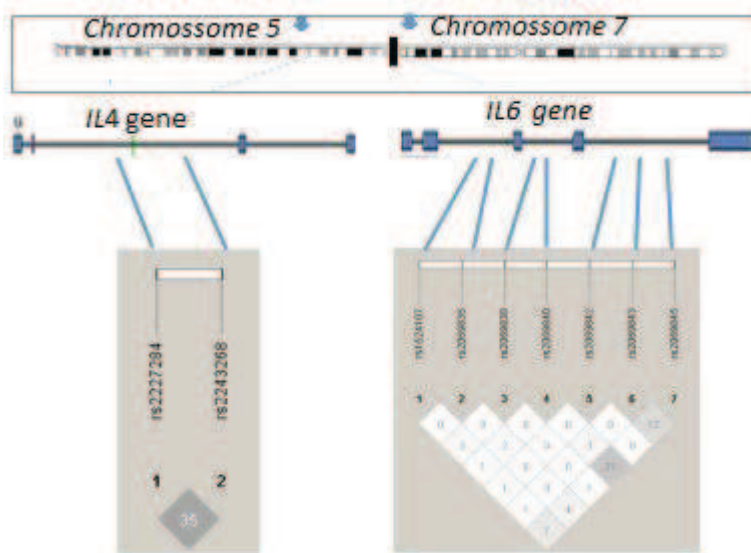
<sup>a</sup> identification of SNP based in NCBI dbSNP; <sup>b</sup> the first letter indicates the common allele and the second is the most uncommon; \* Pearson Chi-Square Test.

**Table 6.** Multivariate models for *IL6* rs 2069843 (additive).

	<i>p</i> -value *	OR (CI)
Extra-alveolar time < 1 hour	0.002	4.11 (1.7-10.1)
rs 2069843 <i>IL6</i> addictive model	0.049	0.23 (0.1-1.0)

\*Logistic Regression Models. Pearson Chi-Square Test.

**Figure 1:** Tag SNPs and linkage disequilibrium map of *IL4* and *IL6* genes. Sketch representation of linkage disequilibrium ( $r^2 < 0.8$ ) between the two tag SNPs of *IL4* and the seven tag SNPs of *IL6* genes.



**ANEXOS**

## 1. ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Apresentação dos tag SNPs e posição do gene *IL4* no braço longo do cromossomo 5 (Fonte: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Figura 2:** Localização do gene *IL6* no braço curto do cromossomo 7, com a visualização dos tag SNPs (Fonte: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Figura 3:** Exemplo de discriminação alélica no gene *IL4* para o rs2243268 após a PCR em tempo real no aparelho 7500 (Applied Biosystem).

**Figura 4:** Exemplo de discriminação alélica no gene *IL6* para o rs2069843 após a PCR em tempo real no aparelho 7500 (Applied Biosystem).

**Figura 5:** Representação esquemática da ativação dos receptores RANK, RANKL e OPG por citocinas pró e anti inflamatórias.

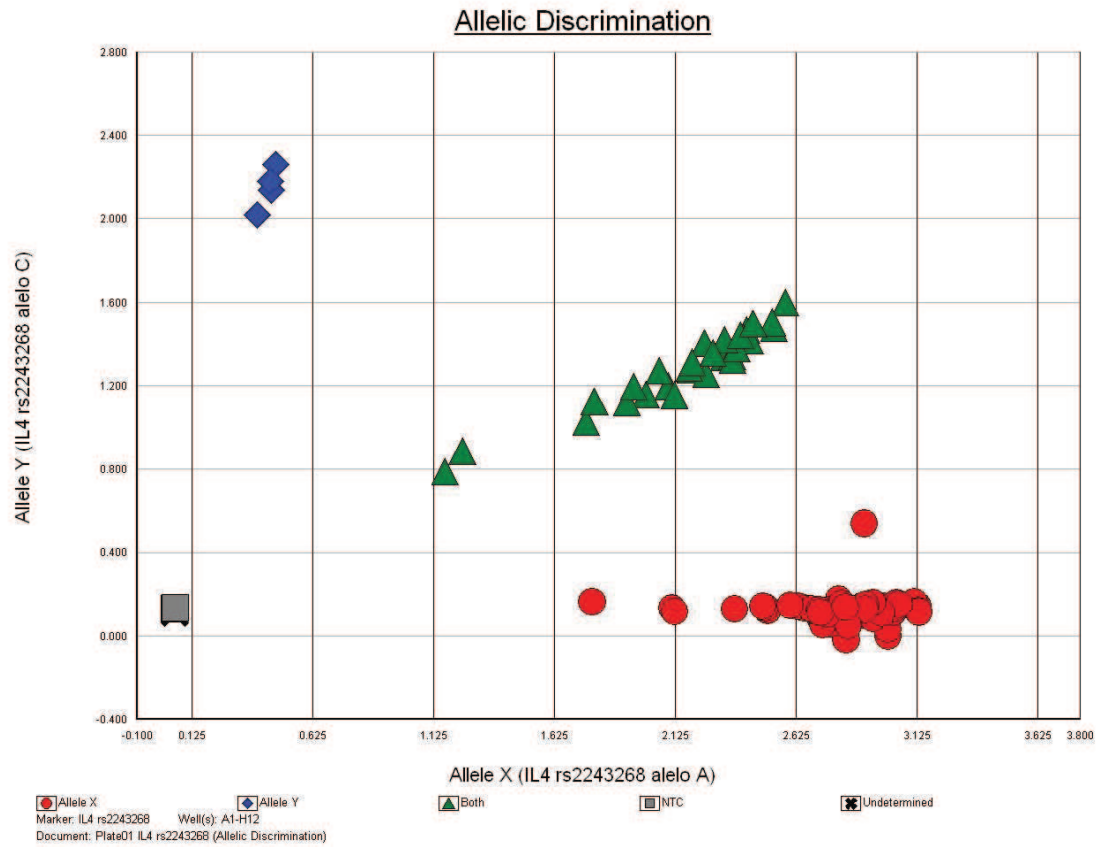


**Figura 1:** Apresentação dos tag SNPs e posição do gene *IL4* no braço longo do cromossomo 5 (Fonte: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

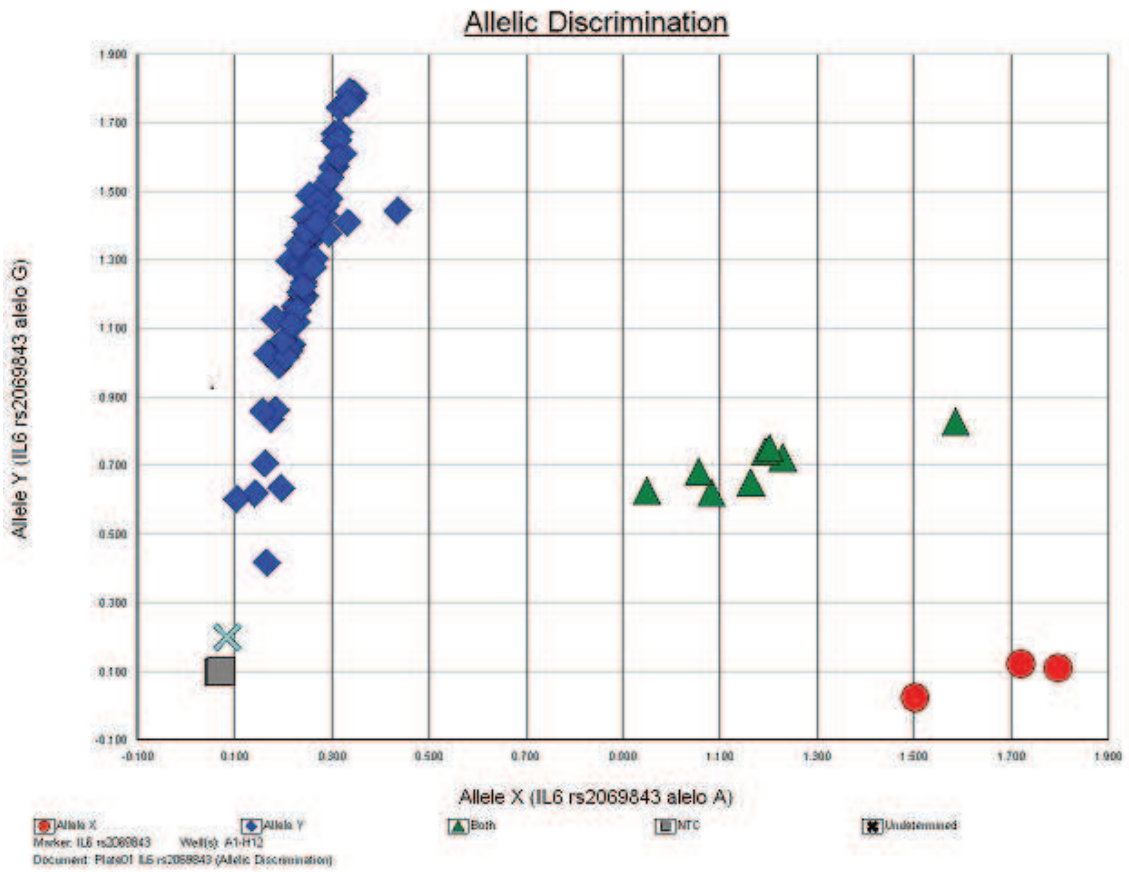


**Figura 2:** Localização do gene *IL6* no braço curto do cromossomo 7, com a visualização dos tag SNPs (Fonte: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

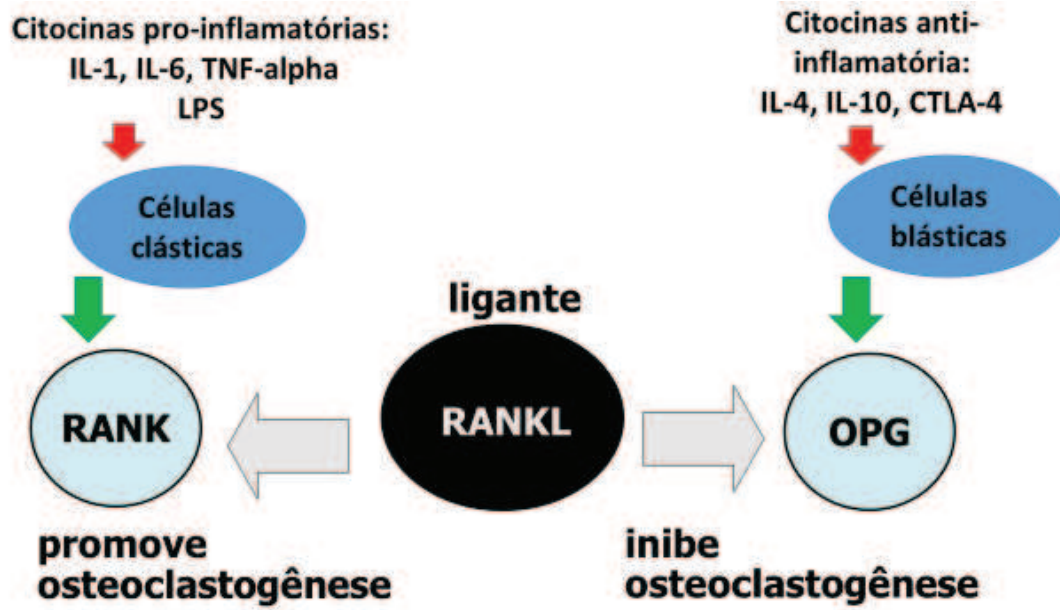




**Figura 3:** Exemplo de discriminação alélica no gene *IL4* para o rs2243268 após a PCR em tempo real no aparelho 7500 (Applied Biosystem).







**Figura 4:** Exemplo de discriminação alélica no gene *IL6* para o rs2069843 após a PCR em tempo real no aparelho 7500 (Applied Biosystem).



**Figura 5:** representação esquemática da ativação dos receptores RANK, RANKL e OPG por citocinas pró e anti inflamatórias.

## PARECER DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

 <p><b>PUCPR</b></p>	<p><b>PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ</b>  <b>Núcleo de Bioética</b>  <b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>  <b>Câmpus das Faveletas</b></p> <p><b>PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA</b></p>	<p>Protocolo: CEP/PP/2010/</p> <p>Grupo: III</p> <p>Série: 003</p>
<p>Formulário Nº: 00043000180</p> <p>Título do projeto: <b>Análise da associação da poliorritmia em genes da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro em dentes transplantaos</b></p> <p>Inscrição CONEP: 0720.0.004.000-10</p> <p>Instituição: <b>Odebrecht (na PUCPR)</b></p> <p style="text-align: right;">Pesquisador responsável: <b>VÂNIA DITZEL WISNIEWSKI</b></p>		
<p><b>Objetivos</b></p> <p><b>OBJETIVOS GERAIS:</b>          O objetivo do presente trabalho é investigar a associação entre poliorritmias em genes da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e a restrição em dentes transplantaos.</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b>          O objetivo do presente trabalho é investigar a associação entre poliorritmias em genes da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e a restrição radiolar e periapical em dentes transplantaos.</p>		
<p><b>Conteúdo e considerações</b></p> <p><b>TIPO DE ESTUDO:</b>          Estudo de coorte</p> <p>A pesquisa consistirá de 50 pacientes, de ambos os sexos, de todas as idades, atendidos na Clínica de Trauma, do Curso de Odontologia da PUCPR, em situação de trauma dentário, a partir da aprovação deste CEP, pelo período compreendido de dois anos (estudo entre 2010 a 2012).</p> <p><b>CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. todos os pacientes, de ambos os sexos, atendidos na Clínica de Trauma, do Curso de Odontologia da PUCPR, no setor de Trauma dentário.</li> <li>2. pacientes que possuem sua continuidade clínica e radiográfica em período inferior a 1 ano.</li> <li>3. pacientes que não tiveram uso de restrição de uso cerâmico.</li> <li>4. pacientes com boa higiene bucal.</li> </ol> <p><b>INSTRUMENTOS METODOLÓGICOS</b>          Otimização de DNA</p> <p>O DNA será obtido a partir de células epiteliais de mucosa bucal, por um bochecho com solução de glicose a 1% por 1 min, e livre congelado de novo, pagu com equidade de rodeta associada. O DNA será purificado com o método de análise a 10 M e 100% a 1 mL (Mullis &amp; Faloon 2007).</p>		
<p><b>Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.</b></p> <p>Presente termo, objetivo e de acordo com as recomendações para os diferentes tipos de estudos.</p>		
<p><b>Conclusões</b></p> <p>Aprovado</p> <p>Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções, Normas e Diretrizes relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: 12/10/2010, manifestou-se por considerar o projeto <b>Aprovado</b>.</p>		
<p><b>Situação Aprovada</b></p> <p>Entretanto, caso ocorra algum problema que, no transcurso da realização do estudo, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber notificação escrita sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo a a critério do pesquisador nos casos de relevância, além de enviar documentação de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Simultaneamente, a atualizado de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou cancelamento do protocolo deverão ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo ser modificada e as suas justificativas.</p> <p>Caso o projeto, ou parte dele, não for executado em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar atos de receber a aprovação formal para a sua realização. O documento que atesta a início da pesquisa deve ser entregue e assinado pelo responsável da instituição a deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser solicitado por este CEP em qualquer tempo.</p>		
<p>Curitiba, 12 de Outubro de 2010.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-end;"> <div style="width: 40%;"> <p>  <b>Prof. MsC. Nairi Azeff-Filho</b>            Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa            PUC-PR</p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;">  </div> <div style="width: 20%; text-align: center;">  </div> </div>		

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da Pesquisa: ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA DO HOSPEDEIRO EM DENTES TRAUMATIZADOS**

Pesquisadores:           Liliane Roskamp  
                                  Vânia Portela Ditzel Westphalen  
                                  Paula Cristina Trevilatto

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155  
                  CEP: 80215-901 - Prado Velho - Curitiba – PR  
                  Telefone: 3271-2108

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, entendo que estou sendo convidado(a) para participar de um projeto de pesquisa chamado *Análise Da Associação De Polimorfismos Em Genes Da Resposta Imuno-Inflamatória Do Hospedeiro Em Dentes Traumatizados*, e que minha participação é VOLUNTÁRIA.

As informações existentes neste documento são para que eu entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa e saber que a minha participação é espontânea. Eu entendo que a recusa, por minha parte, em continuar a participar desta pesquisa em qualquer momento ocorrerá sem penalidades para a minha pessoa.

Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida, eu entendo que deverei fazer perguntas aos pesquisadores para que possa entender perfeitamente do que se trata. **“Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um e-mail para [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br)”**.

Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por pesquisadores cirurgiões-dentistas empenhados na pesquisa e tratamento da reabsorção dentária em dentes traumatizados, e que os resultados serão publicados sem a devida identificação dos participantes. Autorizo aos participantes do estudo a utilizar os meus registros de histórico médico atual e progresso, a qualquer tempo durante a pesquisa, sabendo que estes não serão divulgados.

Eu entendo que serei submetido a coletas de amostras de saliva para análise da presença de indicadores de inflamação para que o material genético (DNA) de minhas células seja estudado.

Eu entendo que minha saliva será guardada para análises biológicas que complementem o andamento do projeto. Para tanto, entendo que terei que informar o pesquisador responsável se mudar meu endereço e/ou telefone de contato, para que eu possa ser informado e autorize o uso de meu material biológico em análises diferentes das que foram propostas nesse estudo. A saliva será armazenada em freezer -20 graus centígrados no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

Eu entendo que os objetivos desta pesquisa são encontrar modificações genéticas que sejam responsáveis por aumentar a reabsorção dentária, o que auxiliará no diagnóstico precoce e na prevenção de complicações e do seu agravamento, na tentativa de interferir na sua progressão.

Eu entendo que não terei custos financeiros durante a pesquisa, além de contar com tratamento endodôntico, quando necessário.

Eu, \_\_\_\_\_,  
 natural de \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_,  
 \_\_\_\_\_, CPF nº \_\_\_\_\_,  
 estado civil \_\_\_\_\_, morador à  
 rua \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, li e compreendi todas as informações que foram passadas a mim sobre a minha participação neste projeto de pesquisa. Também a mim foi dada a oportunidade de discutir e fazer perguntas. Todas as minhas perguntas foram

respondidas satisfatoriamente. Concordo voluntariamente com a minha participação neste estudo. Receberei uma cópia assinada deste formulário de consentimento informado. Minha concordância em participar deste estudo não retira nenhum dos meus direitos legais, no caso de negligência ou má prática de qualquer pessoa ou instituição que esteja envolvida neste estudo. **“Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um e-mail para [nep@pucpr.br](mailto:nep@pucpr.br)”**.

Data: .....

Testemunha: .....

Testemunha: .....

Após a autorização para a realização desta pesquisa junto ao Comitê de Ética, os pesquisadores abaixo nominados vêm, através deste termo, assumir o compromisso de que as identidades das pessoas entrevistadas serão mantidas em absoluto sigilo e anonimato. Além disso, garantem que todas as informações coletadas serão utilizadas, estritamente, para a realização do projeto de pesquisa e elaboração de artigos científicos, mantendo-se confidenciais. Declaramos que toda nova pesquisa a ser realizada com o material (saliva) será submetida à aprovação do CEP/CONEP.

Pesquisadores:

---

Profª Drª Vânia Portela Ditzel Westphalen – Pesquisadora Responsável

---

Profª Drª Paula Cristina Trevilatto

---

Liliane Roskamp – telefone: 3336.2452