



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOCÊNCIAS**

THAYSA FEDALTO LOPES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
GENE *IL4* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES**

Curitiba

2016

THAYSA FEDALTO LOPES

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
GENE *IL4* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Odontologia da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de concentração em
Biociências.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Cristina
Trevilatto.**

Curitiba

2016

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

L864a 2016	Lopes, Thaysa Fedalto Análise da associação de polimorfismos no gene <i>IL4</i> com a perda de mini-implantes / Thaysa Fedalto Lopes ; orientadora, Paula Cristina Trevilatto. – 2016. 46 f. : il. ; 30 cm Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016 Inclui bibliografias Texto em português e inglês 1. Polimorfismo (Genética). 2. Aparelhos ortodônticos. 3. Odontologia. I. Trevilatto, Paula Cristina. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. CDD 20. ed. – 617.6
---------------	---

TERMO DE APROVAÇÃO

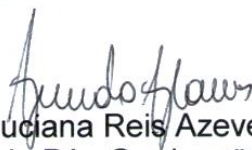
THAYSA FEDALTO LOPES

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE IL4 COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES

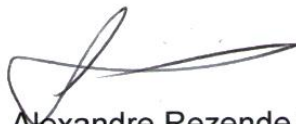
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Biociências**.



Orientador(a): Profª Drª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR



Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira
Academic Department of Oral Biology, University of Pittsburgh

Curitiba, 21 de novembro de 2016.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página Título	1
Resumo	2
Introdução.....	3
Materiais e Métodos.....	6
Resultados.....	9
Discussão	11
Conclusão.....	14
Ilustrações	15
Tabelas.....	17
ARTIGO EM INGLÊS	21
Title page.....	21
Abstract	22
Introduction.....	23
Materials and Methods.....	26
Results.....	29
Discussion	31
Conclusion.....	34
Figures.....	35
Tables.....	37
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	45
Lista de abreviaturas e siglas	45
Parecer do comitê de ética	46
Normas para publicação	47

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Página Título

ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL4* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES

LOPES TF¹, SOUZA CM¹, REICHOW AM¹, MELO AC², TREVILATTO PC¹

¹ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155. Curitiba, Paraná, Brasil.

² Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO). Rua Jacarezinho, 656. Curitiba, Paraná, Brasil.

Correspondência: Paula Cristina Trevilatto. Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Brasil. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho. Curitiba – PR, Brasil. CEP: 80242-980. Telefone: +55 (41) 3271-1505, e-mail: paula.trevilatto@pucpr.br

Os autores negam qualquer conflito de interesse.

Resumo

Objetivo O objetivo deste trabalho foi investigar a associação de características clínicas e de dois tag SNPs do gene *IL4* (rs2227284 e rs2243268) com a perda de mini-implantes.

Materiais e métodos A amostra estudada foi composta de 135 pacientes: 104 pacientes sem nenhuma perda de mini-implante e 31 pacientes apresentando pelo menos um mini-implante perdido. Genótipos foram determinados pela técnica de PCR em tempo real. Análises bivariada e multivariada foram realizadas ($p < 0,05$).

Resultados Análises estatísticas não mostraram associação entre os tag SNPs selecionados e a perda de mini-implantes. Nos indivíduos que tiveram mais de dois mini-implantes instalados (77,4%), o alelo C no modelo recessivo do polimorfismo rs2243268 do gene *IL4* esteve mais presente no grupo com menos de dois MIs instalados [$p = 0,043$, OR: 0,65 (0,58-0,74)]. Após a análise multivariada, hábitos de fumo associaram-se significativamente com o grupo com instalações múltiplas de MIs ($p = 0,036$), contudo, a significância da associação com o rs2243268 não foi mantida.

Conclusão Não houve associação das variáveis sociodemográficas, do hábito de fumo e dos polimorfismos genéticos do gene *IL4* com a perda de mini-implantes. O polimorfismo rs2243268 do gene *IL4* foi associado ao grupo de pacientes que tiveram instalações múltiplas de MIs. Porém, após análise multivariada o fumo associou-se ao grupo com instalação múltipla de MIs e a associação do polimorfismo rs2243268 não foi mantida.

Relevância Clínica Este estudo reforça a interação entre fatores do hospedeiro e ambientais influenciando a suscetibilidade à perda de mini-implantes.

Palavras-chave: mini-implante; perda de mini-implante; polimorfismos; *IL4*.

Introdução

Ao longo da história da ortodontia, houve repetitivos esforços para melhorar a ancoragem [1]. Inicialmente, dentes eram usados para ancoragem, contudo esses dentes moviam-se junto com aqueles para quais o movimento era desejado. Após Bränemark fornecer a base biológica da osseointegração, diferentes métodos de ancoragem esquelética para a ortodontia foram sugeridos [2-6]. No tratamento ortodôntico, resultados clínicos satisfatórios requerem um controle adequado da ancoragem.

Mini-implantes (MIs) são dispositivos intraósseos temporários usados em situações onde a biomecânica ortodôntica, como o movimento em massa, são necessárias [7]. Desde sua introdução, o uso de MIs ganhou popularidade, devido a sua facilidade de instalação e remoção, seu baixo custo e possibilidade de carga imediata após a instalação. Estudos demonstram que se uma ancoragem máxima é necessária, MIs devem ser o sistema adotado [8-10].

MIs são efetivos para ancoragem, e seu sucesso depende de inúmeros fatores, como por exemplo, estabilidade mecânica e quantidade de carga [11], idade do paciente [12], padrão esquelético vertical [13], presença de inflamação [14, 15] e fatores genéticos [16]. A média da taxa de sucesso dos MIs é de 87,8% [17]. A perda inesperada de um MI levará a uma alteração do plano de tratamento original, o que pode ser desfavorável quando uma ancoragem absoluta é necessária. A inflamação mostrou ser o principal fator na falha de MIs, levando à destruição de tecido ósseo e afetando a estabilidade mecânica [18].

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica produzida principalmente por células T auxiliares tipo 2 (Th2). Essa citocina possui um papel na imunidade humoral e celular, regulando proliferação celular, apoptose, ativação de células

efetoras e expressão de vários genes em diferentes tipos celulares [19-22]. Além disso, a IL-4 reduz a produção de monócitos [23], que estão envolvidos em muitas modificações inflamatórias. A IL-4 é responsável pelo equilíbrio da inflamação através da supressão de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , IL-1 e PGE₂, que são conhecidas pelo seu papel em reações inflamatórias e imunes [24]. Nowzari et al (2008) investigaram a presença de determinadas citocinas após a instalação de implantes dentários e encontraram níveis significantes de IL-1 β e TNF- α no fluido crevicular até 6 meses após a instalação do implante, o que pode ter levado a uma reabsorção do tecido ósseo [25]. Além do mais, a IL-4 inibe a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs), responsáveis pela degradação da matriz extracelular [26].

O gene humano *IL4* (interleucina 4 [*Homo sapiens (human)*] gene; IL4; NCBI Reference Sequence: NG_023252.1, OMIM: 147780) está localizado no cromossomo 5q31.1 e é composto por 4 éxons e 3 íntrons em aproximadamente 10 kb [27].

Polimorfismos de base única (SNPs) são variações no DNA com alteração de um único nucleotídeo na sequência do genoma. SNPs são o tipo mais comum de variação no DNA entre indivíduos, com uma frequência superior a 1% do alelo mais raro em uma população. Um SNP localizado em uma sequência codificadora de um gene pode influenciar a proteína correspondente, causando uma alteração na função ou na expressão e, assim, pode estar associado com susceptibilidade a certas doenças [28].

Atualmente, centenas de SNPs do *IL4* já foram detectados no genoma humano, alguns influenciando a expressão da IL-4, levando a uma resposta imune enfraquecida e deixando o hospedeiro sujeito a doenças inflamatórias [29].

Variações genéticas do hospedeiro no gene *IL4* já foram associadas com diversas doenças, como hepatite C e carcinoma hepatocelular [30], artrite reumatoide e esclerose múltipla [31], insuficiência renal aguda [32], câncer de reto [33] e diferentes condições respiratórias [34-36]. SNPs nesse gene também foram associados com a perda de implantes [27] e com a progressão de gengivite para periodontite [37].

Nos últimos anos, os fatores envolvidos no sucesso de MIs foram estudados extensivamente. Contudo, até o momento, existe apenas um estudo relacionando a perda de MIs com fatores genéticos, cujo gene candidato investigado foi o gene *IL6* [16]. O objetivo desse estudo foi investigar a associação de polimorfismos no gene *IL4* com a perda de MIs.

Materiais e Métodos

População de Estudo

Um total de 487 prontuários do Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO), Curitiba, PR, Brasil, datando de 2004 a 2010, foram analisados. Destes, 148 pacientes foram tratados com MIs ortodônticos (NEODENT® Implante Osteointegrável) e foram recrutados para esse estudo. Oito pacientes foram excluídos, por apresentarem sífilis, gravidez ou lactação e cinco recusaram-se a participar do estudo.

Esse estudo foi desenvolvido, então, com um grupo de 135 pacientes de ambos sexos, com média de idade de $48,7 \pm 10$ anos, variando entre 20 e 76 anos de idade. O grupo controle consistiu de 104 pacientes sem nenhum MI perdido, em função por pelo menos 6 meses, e o grupo estudo consistiu de 31 pacientes que apresentaram pelo menos um MI perdido.

Todos os pacientes responderam um questionário sobre o status sócio demográfico e hábitos de fumo e assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, protocolo 5693/10. O número de MIs instalados e perdidos foi obtido da ficha clínica dos pacientes. Fatores socioeconômicos, histórico médico e odontológico desses pacientes foram avaliados e os resultados podem ser encontrados no estudo de Reichow et al [16].

Coleta de DNA

Células foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose 3% e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada [38]. O DNA foi extraído de células bucais epiteliais com acetato de amônia 10 M e EDTA 1 mM [39].

Análise dos tag SNPs do gene *IL4*

SNPs adjacentes frequentemente estão correlacionados em termos de desequilíbrio de ligação (DL). Quando esses SNPs estão em forte DL, eles podem capturar a informação de outros SNPs do mesmo bloco (ou *bin*) e são denominados tag SNPs. A estratégia de genotipar tag SNPs tem como objetivo capturar a informação de um gene inteiro, reduzindo custos e tempo [40]. Genotipar tag SNPs evita a necessidade de genotipar todos os SNPs de um determinado gene. Assim, tag SNPs do gene *IL4* foram selecionados de acordo com informações disponíveis no site do projeto internacional HapMap (www.hapmap.org), *release* 24. Todos os marcadores selecionados apresentaram uma frequência alélica mínima (FAM) de 0,05 na população CEU (descendentes do Norte e Oeste da Europa). Essa população foi escolhida porque os pacientes selecionados para esse estudo eram da região Sul do Brasil, que é considerada uma população com descendência Europeia. De acordo com o Censo Demográfico Brasileiro, em 2010, 70% da população do Paraná eram caucasianos. O parâmetro de corte adotado para definir o DL entre dois marcadores foi um logaritmo multimarcador de $r^2 > 0,8$, considerado um alto nível de DL. Utilizando esses critérios, os seguintes tag SNPs foram selecionados: SNP rs2243268 e rs2227284 (Fig. 1), capturando toda a informação do gene *IL4*.

Pacientes foram genotipados para os tag SNPs pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com o uso da tecnologia Taqman™ Genotyping Master Mix (Applied Biosystems).

Análise estatística

As análises estatísticas e o cálculo do *power* amostral foram realizados no programa SPSS, versão 20.0. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (95% IC) foram determinados quando possível. O programa Haploview 4.2 foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação.

Variáveis nominais foram apresentadas como frequência e porcentagem. O teste qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre variáveis binárias. Variáveis contínuas foram classificadas por distribuição, como normal ou não-normal. As variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney. Os seguintes modelos genéticos de associação entre os marcadores (tag SNPs) foram avaliados: modelos aditivo, dominante e recessivo, analisados pelo teste qui-quadrado de Pearson. 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

Um total de 135 pacientes foram genotipados para esse estudo. A Tabela 1 descreve as características clínicas e demográficas dos indivíduos.

O teste qui-quadrado de Pearson não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos na idade, gênero, etnia e hábitos de fumo.

A taxa de sucesso dos MIs nesse estudo foi de 77%. Análise mostrou que 23% dos pacientes da amostra (31 de 135 pacientes) apresentaram pelo menos um MI perdido, e desses 31 pacientes, 5,9% (8 pacientes) apresentaram dois ou mais MIs perdidos (perdas múltiplas). Além do mais, quando mais que dois MIs foram instalados, a taxa de falha foi de 77,4%. Múltiplas instalações de MIs foram associadas com a falha de MIs [$p=0,000$, OR: 2,03 (IC 1,46-2,82)]. Para esta variável, o cálculo do poder da amostra foi realizado e, ao aceitar a hipótese alternativa (H_1), o poder do teste foi superior a 99%.

Os tag SNPs rs2227284 e rs2243268 selecionados para esse estudo não estavam em alto desequilíbrio de ligação ($r^2 < 0,8$) (Fig. 2). A distribuição genotípica para os dois SNPs estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. Nenhum dos tag SNPs do gene *IL4* teve uma associação significativa com a perda de MIs. A distribuição genotípica de acordo com o modelo genético encontra-se nas tabelas 2 e 3.

Como a maioria dos indivíduos tiveram mais de dois MIs instalados (77,4%), por conta principalmente da reinstalação, foi investigada a possível associação com alelos específicos dos polimorfismos testados (Tabela 4). O alelo C do rs2243268 no modelo recessivo esteve menos presente no grupo que apresentava mais de dois MIs instalados [$p=0,043$, OR: 0,65 (0,58-0,74)].

Após a análise multivariada, hábitos de fumo associaram-se significativamente com o grupo de pacientes que apresentaram múltiplas instalações de MIs ($p=0,036$), contudo, a significância da associação do rs2243268 não foi mantida.

Discussão

Desde a introdução dos MIs como um sistema de ancoragem intrabucal, eles tornaram-se uma importante parte do plano de tratamento ortodôntico. Apesar de serem estudados por vários anos, a falha de MIs é complexa e os achados sobre os aspectos etiológicos na literatura são inconclusivos.

A definição de sucesso para MIs se dá quando os mesmos são mantidos no osso até o final do tratamento ou até a remoção intencional [14]. No geral, a taxa de sucesso de MIs varia dramaticamente de acordo com diferentes procedimentos clínicos, como a técnica de instalação [16], mobilidade e lado da instalação [14] e fatores do hospedeiro [41]. Características clínicas relacionadas aos MIs foram estudadas para essa amostra e os resultados estão apresentados no estudo de Reichow et al [16]. Contudo, existe uma condição em comum para o sucesso dos MIs, a ausência de inflamação [17].

Neste estudo, a taxa de sucesso foi de 77%, um pouco abaixo quando comparada a outros estudos [42, 43].

O tratamento ortodôntico normalmente é procurado por uma população mais jovem, assim MIs são mais utilizados em pacientes com uma média de idade de 20 anos e até hoje não é conclusivo se a idade interfere com a perda de MIs [44, 45]. Nesse estudo, a idade média para ambos os grupos foi de 48 anos, uma idade incomum quando comparada com demais estudos. Isso deve-se ao fato de que a maioria dos pacientes selecionados para esse estudo estavam sendo preparados para receber próteses dentárias sobre implantes.

A ausência da associação entre gênero e perda de MIs já foi previamente reportada na literatura [14]. Este estudo está de acordo com esse achado.

Não é adequado analisar a população brasileira em grupos separados de acordo com as características étnicas, pois brasileiros possuem uma sobreposição de genótipos devida à miscigenação [46]. Apesar disso, comparamos os grupos de acordo com a etnia, e nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Neste estudo, indivíduos que tiveram mais que dois MIs instalados apresentaram risco dobrado de perder MIs. Yao et al (2015), avaliando a estabilidade de MIs para ancoragem ortodôntica, encontraram uma associação entre o número de MIs instalados por paciente e altas taxas de falha [45]. Quando analisamos o grupo com até dois MIs contra o grupo com mais de dois MIs instalados, o alelo C no modelo recessivo do rs2243268 do gene *IL4* esteve significativamente mais frequente no grupo com menos MIs instalados. Quando a análise multivariada foi realizada nos grupos de acordo com o número de MIs instalados, o sinal de associação do polimorfismo rs2243268 não foi mantido. Isso pode ser explicado pelo fato de que polimorfismos genéticos em genes diferentes podem contribuir individualmente com uma pequena proporção na modulação imuno-inflamatória. Contudo, o fumo associou-se ao grupo com múltiplas instalações de MIs. O fumo é conhecido como um causador da falha de implantes e foi demonstrado que fumantes possuem 2,5 vezes mais chances de perder um implante quando comparados a não-fumantes [47]. Desse modo, o fumo pode silenciar a influência de um polimorfismo genético [48]. Kornman et al (1997) sugeriram que o fumo é um fator de risco tão forte que pode ter afetado um polimorfismo do gene *IL1 β* , modulando a suscetibilidade à periodontite crônica [49]. Na presença do fumo, um conhecido fator de risco, que impacta significativamente a resposta do hospedeiro, a influência do alelo polimórfico de proteção deve ter sido mascarada. Outra consideração é que a associação pode ter sido espúria devido à

baixa frequência do alelo mais raro (alelo C) do rs2243268. A amostra deve ser aumentada para confirmar tal associação. Além disso, uma replicação do estudo em outras populações é obrigatória antes de concluir que o rs2243268 é um marcador genético de suscetibilidade à perda de MIs.

Esse é o primeiro artigo que investigou a associação de polimorfismos no gene *IL4* com a perda de MIs. O tag SNP rs2243268 foi associado à resistência contra tuberculose em crianças chinesas [50] e com efeitos adversos após vacina de sarampo [51]. Porém, o alelo A foi o alelo de proteção, diferentemente do que encontramos em nosso estudo. Essa discrepância nos achados pode ser parcialmente explicada pela diferença genética das populações e pelo mecanismo molecular etiopatológico por trás dessas doenças complexas. Nesse contexto, os resultados do presente estudo fortemente sugerem que fatores do hospedeiro e do ambiente interagem profundamente para modular a suscetibilidade a traços complexos, o que os caracteriza como multifatorial.

Conclusão

Em conclusão, nenhuma associação foi encontrada entre os tag SNPs do gene *IL4* e a falha de MIs. Contudo, o alelo C no modelo recessivo do rs2243268 do gene *IL4* esteve menos presente no grupo com mais de dois MIs instalados. Após a análise multivariada, hábitos de fumo associaram-se ao grupo com instalações múltiplas, porém, a associação encontrada com o polimorfismo rs2243268 desapareceu. Este estudo reforça a existência de interações entre fatores do hospedeiro e ambientais e sua influência na suscetibilidade a determinadas condições complexas.

Ilustrações

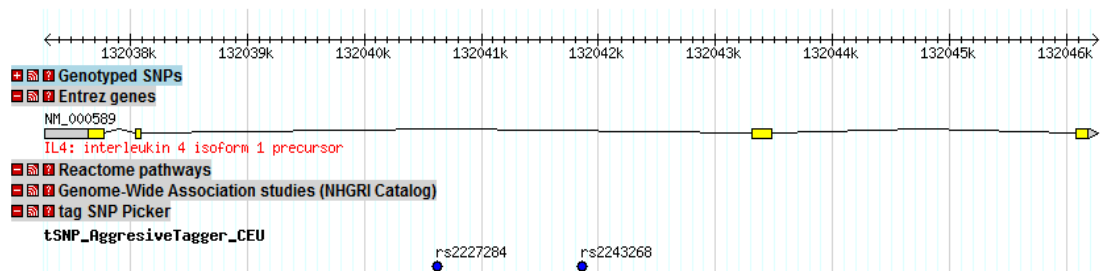


Fig. 1 Gene *IL4* com os tag SNPs com uma frequência alélica mínima (FAM) de 0,05
(Fonte: HapMap)

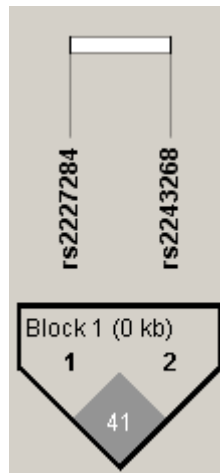


Fig. 2 Análise de desequilíbrio de ligação (DL) entre os tag SNPs selecionados do gene *IL4*. O número dentro do quadrado mostra a proporção de DL em porcentagem (41%). O DL entre os tag SNPs é de $r^2 < 0,8$

Tabelas

Tabela 1 Resultados da análise bivariada, considerando as variáveis sócio demográficas e clínicas para os grupos controle e estudo.

Dados Gerais	Grupo Controle		Grupo Estudo		Bivariada valor- <i>p</i>	Bivariada OR
	n=104	%	n=31	%		
Gênero						
Masculino	29	27,9	7	22,6	0,558*	1,32 (0,52 – 3,41)
Feminino	75	72,1	24	77,4		
Idade	48,69±10,31		48,77±9,11		0,888**	--
Etnia						
Caucasiano	73	70,2	22	71,0	0,934*	0,96 (0,40 – 2,33)
Não-Caucasiano	31	29,8	9	29,0		
Hábitos de Fumo						
Fumantes + ex-fumantes	26	25,0	12	38,7	0,136*	1,17 (0,93-1,49)
Não-fumantes	78	75,0	19	61,3		
Número de MIs instalados por paciente						
1 ou 2	84	80,8	7	22,6	0,000*	2,03 (1,46 – 2,82)
3, 4 ou 5	20	19,2	24	77,4		

* Teste qui-quadrado de Pearson. ** Teste de U Mann-Whitney.

Tabela 2 Análise genotípica dos tag SNPs do gene *IL4* no modelo aditivo.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alelos*	Grupos	Genótipos			Valor- <i>p</i> **
rs2227284 ^b	[G/T]		GG	GT	TT	0,683
		Controle n (%)	33 (33,0)	51 (51,0)	16 (16,0)	
		Estudo n (%)	9 (31,0)	17 (58,6)	3 (10,3)	
rs2243268 ^c	[A/C]		AA	AC	CC	0,280
		Controle n (%)	61 (58,7)	35 (33,7)	8 (7,7)	
		Estudo n (%)	20 (64,5)	11 (35,5)	0 (0,0)	

^a Identificador do SNP baseado no banco de dados de SNPs do NCBI. ^b Grupo Controle n=100, Grupo Estudo n=29. ^c Grupo Controle n=104, Grupo Estudo n=31. * O primeiro alelo é o alelo mais frequente, e o segundo o alelo, o mais raro. ** Teste qui-quadrado de Pearson.

Tabela 3 Análise genotípica dos tag SNPs do gene *IL4* nos modelos dominante e recessivo.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alelos*	Grupos	Genótipos		Valor-p**	OR (IC 95%)
rs2227284 ^b (Dom T)	[G/T]		TT + GT	GG	0,842	0,914 (0,38-2,23)
		Controle n (%)	67 (67,0)	33 (33,0)		
		Estudo n (%)	20 (69,0)	9 (31,0)		
rs2227284 ^b (Rec T)	[G/T]		GT + GG	TT	0,449	0,606 (0,16-2,24)
		Controle n (%)	84 (84,0)	16 (16,0)		
		Estudo n (%)	26 (89,7)	3 (10,3)		
rs2243268 ^c (Dom C)	[A/C]		AC + CC	AA	0,559	1,282 (0,56-2,95)
		Controle n (%)	43 (41,3)	61 (58,7)		
		Estudo n (%)	11 (35,5)	20 (64,5)		
rs2243268 ^c (Rec C)	[A/C]		AA + AC	CC	0,111	---
		Controle n (%)	96 (92,3)	8 (7,7)		
		Estudo n (%)	31 (100)	0 (0,0)		

^a Identificador do SNP baseado no banco de dados de SNPs do NCBI. ^b Grupo Controle n=100, Grupo Estudo n=29. ^c Grupo Controle n=104, Grupo Estudo n=31. * O primeiro alelo é o alelo mais frequente, e o segundo o alelo, o mais raro. ** Teste qui-quadrado de Pearson.

Tabela 4 Análise genotípica dos tag SNPs do gene *IL4* no grupo com até 2 MIs instalados (≤ 2) e no grupo entre 3 e 5 MIs instalados (> 2) nos modelos dominante e recessivo.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alelos*	Grupos	Genótipos		valor- <i>p</i> **	OR (IC 95%)
rs2227284 ^b (Dom T)	[G/T]	≤ 2 n (%)	TT + GT 61 (70,9)	GG 25 (29,1)	0,232	1,18 (0,89-1,57)
		> 2 n (%)	26 (60,5)	17 (39,5)		
rs2227284 ^b (Rec T)	[G/T]	≤ 2 n (%)	GT + GG 71 (82,6)	TT 15 (17,4)	0,219	0,49 (0,15-1,56)
		> 2 n (%)	39 (90,7)	4 (9,3)		
rs2243268 ^c (Dom C)	[A/C]	≤ 2 n (%)	AC + CC 39 (42,9)	AA 52 (57,1)	0,330	1,12 (0,89-1,42)
		> 2 n (%)	15 (34,1)	29 (65,9)		
rs2243268 ^c (Rec C)	[A/C]	≤ 2 n (%)	AA + AC 83 (91,2)	CC 8 (8,8)	0,043	0,65 (0,58-0,74)
		> 2 n (%)	44 (100)	0 (0,0)		

^a Identificador do SNP baseado no banco de dados de SNPs do NCBI. ^b MIs instalados ≤ 2 , n=86, MIs instalados > 2 , n=43. ^c MIs instalados ≤ 2 , n=91, MIs instalados > 2 , n=44. * O primeiro alelo é o alelo mais frequente, e o segundo o alelo, o mais raro. ** Teste qui-quadrado de Pearson.

ARTIGO EM INGLÊS

Title page

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF *IL4* POLYMORPHISMS WITH MINI- IMPLANT FAILURE

LOPES TF¹, SOUZA CM¹, REICHOW AM¹, MELO AC², TREVILATTO PC¹

¹ School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155. Curitiba, Paraná, Brazil.

² Latin American Institute of Dental Research and Education (ILAPEO). Rua Jacarezinho, 656. Curitiba, Paraná, Brazil.

Correspondence to: Paula Cristina Trevilatto. School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho. Curitiba – PR, Brazil. Post Code: 80242-980. Telephone: +55 (41) 3271-1505, e-mail: Paula.trevilatto@pucpr.br

The authors declare that they have no conflict of interest.

Abstract

Objectives The aim of this study was to investigate the association of clinical characteristics and *IL4* tag SNPs, rs2227284 and rs2243268, with mini-implant failure.

Materials and methods The sample comprised of 135 patients: 104 patients without any mini-implant loss and 31 patients presenting at least one lost mini-implant. Genotypes were determined by real time PCR. Bivariate and multivariate analyses were performed ($p < 0.05$).

Results Statistical analysis showed no association between the selected tag SNPs and mini-implant loss. The allele C of the *IL4* rs2243268 polymorphism in the recessive model was more frequent in patients who presented less MIs installed [$p = 0.043$, OR: 0.65 (0.58-0.74)]. After the multivariate analysis, smoking habits significantly associated with the group with multiple MIs installed ($p = 0.036$), however the significance of the association with rs2243268 was not maintained.

Conclusions There was no association of sociodemographic, smoking and genetic factors studied with MI loss. The polymorphism rs2243268 was associated with subjects who had more than two mini-implants installed. However, after multivariate analysis, smoking was associated with multiple MI installed and the polymorphism rs2243268 did not remain associated.

Clinical Relevance This study supports the interaction between host and environmental factors and its influence on susceptibility to mini-implant failure.

<i>Key words:</i> mini-implant; mini-implant loss; polymorphisms; <i>IL4</i> .
--

Introduction

Throughout the history of orthodontics, there have been repeated efforts to improve the method of anchorage [1]. Initially, teeth were used as a means of obtaining anchorage, however the selected teeth for anchorage often move simultaneously with those in which movement is desired. After Bränemark provided the biologic basis for osseointegration, different skeletal anchorage options in orthodontics have been suggested [2-6]. Satisfactory clinical results in orthodontic treatment require adequate anchorage control.

Mini-implants (MIs) are temporary skeletal anchorage devices used in situations where orthodontic biomechanics such as mass movement of teeth is required [7]. Since their introduction, the use of orthodontic MIs have become widespread and gained in popularity, because of the convenience of the placement and removal procedure, their comparative low cost and possibility of immediate loading after surgery. Studies have shown that if maximum anchorage is required, MIs should be the system of choice [8-10].

MIs are effective as anchorage, and their success depends on numerous factors, including mechanical stability and loading quantity [11], patient's age [12], vertical skeletal pattern [13], inflammation [14,15], and genetic factors [16]. The mean success rate of MIs is 87.8% [17]. The unexpected loss of a MI will lead to a change in the original treatment plan, which can be unfavorable when anchorage is required.

Inflammation has been shown to be a major predictor of MI failure, leading to bone tissue destruction, affecting the mechanical stability of MIs [18].

IL-4 is a pleiotropic anti-inflammatory cytokine produced mainly by T helper type 2 (Th2) cells. This cytokine plays a central role in humoral and cell-mediated

immunity, regulating cell proliferation, differentiation, apoptosis, activation of effector cells, and expression of numerous genes in various cell types [19-22]. In addition, IL-4 reduces the production of functionally important monokines [23], which are implicated in many inflammatory changes. IL-4 is responsible for the equilibrium in inflammation by suppressing pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1, and PGE₂, which are known to play a major role in inflammatory and immune reactions [24]. Nowzari et al (2008), investigating the presence of selected cytokines after placement of dental implants, found out that significant levels of IL-1 β and TNF- α were present in the crevicular fluid up to 6 months after implant placement, which may have led to bone resorption [25]. Furthermore, IL-4 inhibits the secretion of matrix metalloproteinases, mainly responsible to extracellular matrix degradation [26].

The human *IL4* gene (interleukin 4 [*Homo sapiens* (human)] gene; IL4; NCBI Reference Sequence: NG_023252.1, OMIM: 147780) is located on chromosome 5q31.1 and comprises 4 exons and 3 introns in approximately 10 kb [27].

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are variations in the DNA with alterations of a single nucleotide in the genome sequence. SNPs are the most common type of DNA variations between individuals with a frequency higher than 1% of the rarer alleles in the population. A SNP located within the coding sequence of a gene may influence the corresponding protein, causing an alteration on its function or expression and therefore might be associated with susceptibility to human diseases [28].

Currently, hundreds of *IL4* SNPs have been detected in the human genome, some influencing the expression of IL-4, leading to a weakened immune response and making the host vulnerable to inflammation-related diseases [29]. Host genetic

variations in the *IL4* gene were associated with several diseases, such as hepatitis C and hepatocellular carcinoma [30], rheumatoid arthritis and multiple sclerosis [31], acute kidney injury [32], rectal cancer [33], and different respiratory conditions [34-36]. SNPs in this gene have also been associated with implant loss [27] and progression from gingivitis to periodontitis [37].

In the past few years, the factors underlying the success rates of MIs have been studied extensively. So far, however, to the authors' knowledge, there is only one study relating the loss of MIs to genetic factors, which studied the *IL6* gene [16]. The aim of this study was to investigate the association of *IL4* gene polymorphisms with MI failure.

Materials and Methods

Study population

A total of 487 patients' records from the Latin American Institute of Dental Research and Education (ILAPEO), Curitiba, PR, Brazil, dating from 2004 to 2010, were reviewed. From those, 148 patients were treated with orthodontic MIs (NEODENT[™] Implante Osteointegrável) and were recruited for this study. Eight patients with potential confounding factors such as syphilis, current pregnancy or lactation were excluded from the study and five refused to participate in the study. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

This study was carried out on a group of 135 subjects of both sexes, with a mean age of 48.7 ± 10 , range 20–76 years. The control group consisted of 104 patients without any lost MI, whose implants had been in function for at least 6 months and the study group consisted of 31 patients presenting at least one lost MI.

All patients answered a questionnaire about their sociodemographic and smoking habits and signed an informed consent approved by the Ethics Committee in Research at PUCPR, protocol 5693/10. The number of placed and lost MI was observed from the patients' records. Socioeconomic factors, medical and oral clinical variables for these patients were evaluated and the results can be found in the study by Reichow et al [16].

DNA collection

Cells were obtained through a mouthwash with 3% glucose solution and scraping of the oral mucosa with a sterile wood spatula [38]. DNA was extracted from epithelial buccal cells with ammonium acetate 10 M and EDTA 1 mM [39].

Analysis of *IL4* tag SNPs

Adjacent SNPs are often highly correlated in terms of linkage disequilibrium (LD). When those SNPs are in strong LD they can capture the information of others in the same block (or bin) and are called tag SNPs. The strategy of genotyping tag SNPs intends to capture the information of a whole gene, reducing genotyping costs and time [40]. Genotyping them avoids the needs for genotyping all the SNPs of a given gene. Thus, *IL4* gene tag SNPs were selected according to the information available on the International HapMap Project website (www.hapmap.org), release 24. All selected markers presented a minimum allele frequency (MAF) of 0.05 in the CEU (Northern and Western European ancestry) population. The CEU population was chosen because the patients selected for this study were from the south region of Brazil, which is considered a heterogeneous population with a European ancestry. According to the Brazilian Demographic Census, in 2010, 70% of the population from Paraná State were Caucasians.

The cut-off parameter to define LD between two markers was a multimarker $r^2 > 0.8$, considered a high level of LD. Using this criterion, the following tag SNPs were included: reference SNP rs2243268 and rs2227284 (Fig. 1), capturing the whole information of *IL4* gene.

Patients were genotyped for the tag SNPs by the technique of real-time polymerase chain reaction (PCR) (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the use of TaqMan™ Genotyping Master Mix technology (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analyses and sample power were estimated by SPSS 20.0. Odds ratios (OR) and confidence intervals (95% CI) were determined when possible. Haploview

4.2 software was used to evaluate Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium.

Nominal variables were expressed as frequencies and percentages. Pearson chi square test was used to assess the association between binary variables. Continuous variables were first classified by distribution as normal or non-normal. Non-normal continuous variables were analyzed by Mann-Whitney U test. The following genetic models of the association between markers (tag SNPs) were assessed: additive, dominant and recessive models, tested by Pearson chi square. For the multivariate analysis, binary logistic regression model was adjusted to analyze genotypic frequencies, including variables with $p < 0.20$ significance in the bivariate tests as co-variables.

Results

A total of 135 individuals were genotyped for the study. Table 1 describes demographic and clinical characteristics of the subjects.

The Pearson chi-square test failed to show statistically significance difference between the groups in age, gender, ethnic group and smoking habits.

The success MIs rate in this study was 77%. Analysis showed that 23% of the patients from the sample (31 out of 135 patients) presented at least one lost MI and, of these 31 patients, 5.9% (8 patients) presented two or more lost MIs (multiple losses).

Moreover, when more than two MIs were installed the failure rate was 77.4%. This higher number of MIs installed per patient was associated with MI failure [$p=0.000$, OR: 2.03 (CI 1.46-2.82)]. For the variable number of MIs installed per patient, the sample power test was done and, by accepting the alternative hypothesis (H_1), the test's power was above 99%.

The tag SNPs rs2227284 and rs2243268 selected for this study were not in high LD ($r^2 < 0.8$), confirming their independence in the study population (Fig. 2).

The genotype distribution for the two SNPs tested was in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group. Neither *IL4* tag SNPs was significantly associated with MI loss. The genotype distribution according to the genetic models is shown in tables 2 and 3.

Since subjects who had more than two MIs installed concentrated MI loss (77.4%), it was investigated if an association with specific alleles of the two tested polymorphisms could exist (Table 4). Allele C of the rs2243268 in the recessive model was significantly more frequent in the group with less than two MIs installed [$p=0.043$, OR: 0.65 (CI 0.58-0.74)].

After the multivariate analysis, smoking habits significantly associated with the group with multiple MI installation ($p=0.036$), however the significance of the association with rs2243268 was not maintained.

Discussion

Since the introduction of MIs as an intraoral anchorage system, they have become an important part of the orthodontic treatment plan. Although studied for several years, MI failure is a complex trait and inconclusive findings are shown in the literature concerning its etiologic aspects.

Success has been defined when MIs are maintained in bone until the end of treatment or intentional removal [14]. The overall rate for MI success vary dramatically according to different clinical procedures such as the implant placement technique [16], mobility and side of placement [14] and host factors [41]. MIs clinical characteristics for this sample were analyzed and the findings can be found in the study by Reichow et al [16]. However, there is one common condition for MI success, no sign of inflammation [17].

In this study, the success MIs rate was 77%, lower than other studies [42,43].

Orthodontic treatment is usually sought by a young population, therefore MIs are commonly used in patients around 20 years old and so far it is not conclusive if age interferes with MI loss [44,45]. Here the mean age for both groups was approximately 48 years, which is an uncommon age when compared to other reports. That is explained by the fact most of the selected patients were being prepared for prosthetic implant treatment.

The lack of association between gender and MI loss has been previously reported in literature [14]. The present study is in agreement with this finding.

It is not adequate to analyze Brazilians in separate groups based on ethnical characteristics because Brazilian individuals have overlapping genotypes due to miscegenation [46]. Even though, we compared the groups according to ethnic group and no difference was found.

In this study, having more than two MIs installed doubled the risk for presenting MI loss. Indeed, it could be noted that there was an increased failure rate after the second MI installed (77.4%). Yao et al (2015), evaluating the stability of MIs for orthodontic anchorage, found an association between the number of MIs installed per patient and higher failure rates [45]. When we analyzed the group with up to 2 versus more than 2 MIs installed, the allele C of the rs2243268 of *IL4* gene in the recessive model was significantly more frequent in the group with less MIs installed. Once the group with multiple MIs installed presented higher failure rate, we could say allele C was associated with protection against MI loss.

When the multivariate analysis was applied to the groups according to the number of MIs installed, the association signal of the rs2243268 polymorphism was not maintained. That could be explained by the fact that genetic polymorphisms in different genes may contribute individually with a small proportion of the immune-inflammatory modulation. However, smoking did associate with multiple MIs placement, which was associated significantly with MI failure. Smoking is known to cause implant failure and it has been demonstrated that smokers have a 2.5 greater chance of losing an implant when compared to nonsmokers [47]. Thereby, smoking could mute a genetic polymorphism influence [48]. Kornman et al (1997) suggested that smoking is such a strong risk factor that might have had an effect on *IL1 β* polymorphism modulating susceptibility to chronic periodontitis [49]. In the presence of smoking, a strong well-known risk factor, which impairs significantly host response, the influence of the polymorphic protection allele should have been masked. Another consideration is that the association might have been spurious because of the low frequency of the rarer allele (allele C) of the rs2243268. Sample size should be increased to confirm such an association. Moreover, replication in

other populations is mandatory before concluding that rs2243268 is a genetic marker for susceptibility to MI loss.

This is the first report investigating the association of *IL4* polymorphism with MI loss. The tag SNP rs2243268 has been previously reported on literature associated with resistance against extrapulmonary tuberculosis in Chinese Han children [50] and with adverse events after smallpox vaccination [51]. However, allele A was the protection allele, differently from which was found in our study. This discrepancy in the findings might be partially explained by different racial genetic backgrounds and etiopathological molecular mechanisms underlying those complex diseases and traits. In this context, our results strongly suggests that host and environmental factors deeply interact to modulate complex traits susceptibility, which characterize them as multifactorial.

Conclusion

In conclusion, no association of *IL4* tag SNPs with MI failure was found. Nonetheless, an association was observed between multiple installed MIs patients and the C allele in the recessive model of the *IL4* rs2243268. After multivariate analysis, smoking habits associated with the group presenting multiple MIs placement, but the association with the rs2243268 polymorphism disappeared. This study supports the interaction between host and environmental factors and its influence on susceptibility to certain conditions.

Figures

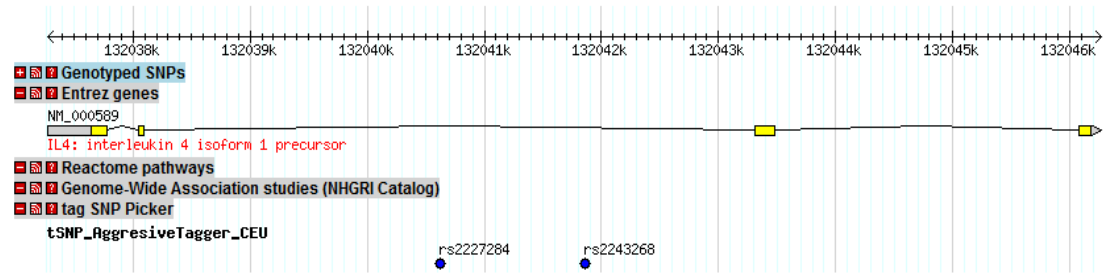


Fig. 1 The *IL4* gene with tag SNPs presenting a minimum allele frequency (MAF) of 0.05
(Font: HapMap)

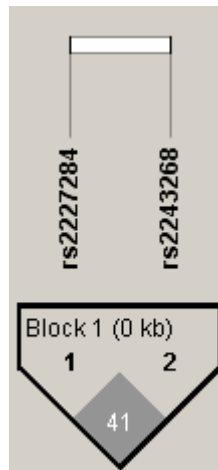


Fig. 2 Analysis of linkage disequilibrium (LD) between the selected *IL4* tag SNPs. The number inside the square shows the proportion of LD as a percentage (41%). The LD between the tag SNPs is $r^2 < 0.8$

Tables

Table 1 Results of bivariate analysis, considering sociodemographic and clinical variables for groups control and study.

General Data	Control Group		Study Group		Bivariate <i>p</i> -value	Bivariate OR
	n=104	%	n=31	%		
Gender						
Male	29	27.9	7	22.6	0.558*	1.32 (0.52 - 3.41)
Female	75	72.1	24	77.4		
Age	48.69±10.31		48.77±9.11		0.888**	--
Ethnic group						
Caucasian	73	70.2	22	71.0	0.934*	0.96 (0.40 - 2.33)
Non-Caucasian	31	29.8	9	29.0		
Smoking habits						
Smokers + ex-smokers	26	25.0	12	38.7	0.136*	1.17 (0.93-1.49)
Non-smokers	78	75.0	19	61.3		
Number of MIs installed per patient						
1 or 2	84	80.8	7	22.6	0.000*	2.03 (1.46 - 2.82)
3, 4 or 5	20	19.2	24	77.4		

* Pearson Chi-Squared test. ** Mann-Whitney U test.

Table 2 Genotypic analysis of the tag SNPs in the *IL4* gene in additive model.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alleles*	Groups	Genotypes			p-value**
rs2227284 ^b	[G/T]		GG	GT	TT	0.683
		Control n (%)	33 (33.0)	51 (51.0)	16 (16.0)	
		Study n (%)	9 (31.0)	17 (58.6)	3 (10.3)	
rs2243268 ^c	[A/C]		AA	AC	CC	0.280
		Control n (%)	61 (58.7)	35 (33.7)	8 (7.7)	
		Study n (%)	20 (64.5)	11 (35.5)	0 (0.0)	

^a SNP identifier based on the NCBI SNP database. ^b Control group n=100, Study group n=29. ^c Control group n=104, Study group n=31. * The first allele is designated as the major allele, and the second allele is designated as the minor allele. ** Pearson Chi-square.

Table 3 Genotypic analysis of the tag SNPs in the *IL4* gene in dominant and recessive models.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alleles*	Groups	Genotypes		p-value**	OR (CI 95%)
rs2227284 ^b (Dom T)	[G/T]		TT + GT	GG	0.842	0.914 (0.38-2.23)
		Control n (%)	67 (67.0)	33 (33.0)		
		Study n (%)	20 (69.0)	9 (31.0)		
rs2227284 ^b (Rec T)	[G/T]		GT + GG	TT	0.449	0.606 (0.16-2.24)
		Control n (%)	84 (84.0)	16 (16.0)		
		Study n (%)	26 (89.7)	3 (10.3)		
rs2243268 ^c (Dom C)	[A/C]		AC + CC	AA	0.559	1.282 (0.56-2.95)
		Control n (%)	43 (41.3)	61 (58.7)		
		Study n (%)	11 (35.5)	20 (64.5)		
rs2243268 ^c (Rec C)	[A/C]		AA + AC	CC	0.111	---
		Control n (%)	96 (92.3)	8 (7.7)		
		Study n (%)	31 (100)	0 (0.0)		

^a SNP identifier based on the NCBI SNP database. ^b Control group n=100, Study group n=29. ^c Control group n=104, Study group n=31. * The first allele is designated as the major allele, and the second allele is designated as the minor allele. ** Pearson Chi-square.

Table 4 Genotypic analysis of the tag SNPs in the *IL4* gene in group with up to 2 MIs installed (≤ 2) and group with MIs installed between 3 and 5 (> 2) in the dominant and recessive models.

Tag SNPs dbSNP ID ^a	Alleles*	Groups	Genotypes		p-value**	OR (CI 95%)
rs2227284 ^b (Dom T)	[G/T]	≤ 2 n (%)	TT + GT 61 (70.9)	GG 25 (29.1)	0.232	1.18 (0.89-1.57)
		> 2 n (%)	26 (60.5)	17 (39.5)		
rs2227284 ^b (Rec T)	[G/T]	≤ 2 n (%)	GT + GG 71 (82.6)	TT 15 (17.4)	0.219	0.49 (0.15-1.56)
		> 2 n (%)	39 (90.7)	4 (9.3)		
rs2243268 ^c (Dom C)	[A/C]	≤ 2 n (%)	AC + CC 39 (42.9)	AA 52 (57.1)	0.330	1.12 (0.89-1.42)
		> 2 n (%)	15 (34.1)	29 (65.9)		
rs2243268 ^c (Rec C)	[A/C]	≤ 2 n (%)	AA + AC 83 (91.2)	CC 8 (8.8)	0.043	0.65 (0.58-0.74)
		> 2 n (%)	44 (100)	0 (0.0)		

^a SNP identifier based on the NCBI SNP database. ^b MIs installed ≤ 2 n=86, MIs installed > 2

n=43. ^c MIs installed ≤ 2 n=91, MIs installed > 2 n=44. * The first allele is designated as the major allele, and the second allele is designated as the minor allele. ** Pearson Chi-square.

REFERÊNCIAS

1. Costello BJ, Ruiz RL, Petrone J, Sohn J (2010) Temporary skeletal anchorage devices for orthodontics. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America* 22 (1):91-105. doi:10.1016/j.coms.2009.10.011
2. Turley PK, Kean C, Schur J, Stefanac J, Gray J, Hennes J, Poon LC (1988) Orthodontic force application to titanium endosseous implants. *The Angle orthodontist* 58 (2):151-162. doi:10.1043/0003-3219(1988)058<0151:OFATTE>2.0.CO;2
3. Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS (1984) Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *American journal of orthodontics* 86 (2):95-111
4. Block MS, Hoffman DR (1995) A new device for absolute anchorage for orthodontics. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 107 (3):251-258
5. Bousquet F, Bousquet P, Mauran G, Parguel P (1996) Use of an impacted post for anchorage. *Journal of clinical orthodontics : JCO* 30 (5):261-265
6. Glatzmaier J, Wehrbein H, Diedrich P (1996) Biodegradable implants for orthodontic anchorage. A preliminary biomechanical study. *European journal of orthodontics* 18 (5):465-469
7. Alves M, Jr., Baratieri C, Mattos CT, Araujo MT, Maia LC (2013) Root repair after contact with mini-implants: systematic review of the literature. *European journal of orthodontics* 35 (4):491-499. doi:10.1093/ejo/cjs025
8. Feldmann I, Bondemark L (2008) Anchorage capacity of osseointegrated and conventional anchorage systems: a randomized controlled trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 133 (3):339 e319-328. doi:10.1016/j.ajodo.2007.08.014
9. Sandler J, Murray A, Thiruvengkatachari B, Gutierrez R, Speight P, O'Brien K (2014) Effectiveness of 3 methods of anchorage reinforcement for maximum anchorage in adolescents: A 3-arm multicenter randomized clinical trial. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 146 (1):10-20. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2014.03.020
10. Yao C-CJ, Lai EH-H, Chang JZ-C, Chen I, Chen Y-J (2008) Comparison of treatment outcomes between skeletal anchorage and extraoral anchorage in adults with maxillary dentoalveolar protrusion. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 134 (5):615-624. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2006.12.022
11. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yu WJ (2009) Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: a systematic review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 135 (3):284-291. doi:10.1016/j.ajodo.2007.08.017
12. Lee S-J, Ahn S-J, Lee JW, Kim S-H, Kim T-W (2010) Survival analysis of orthodontic mini-implants. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 137 (2):194-199. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2008.03.031
13. Moon C-H, Park H-K, Nam J-S, Im J-S, Baek S-H (2010) Relationship between vertical skeletal pattern and success rate of orthodontic mini-implants. *American*

- Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 138 (1):51-57. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2008.08.032
14. Park H-S, Jeong S-H, Kwon O-W (2006) Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 130 (1):18-25. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2004.11.032
 15. Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T (2003) Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics 124 (4):373-378. doi:10.1016/S0889540603005651
 16. Reichow AM, Melo AC, de Souza CM, Castilhos BB, Olandoski M, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC (2015) Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. International journal of oral and maxillofacial surgery. doi:10.1016/j.ijom.2015.11.012
 17. Rodriguez JC, Suarez F, Chan HL, Padial-Molina M, Wang HL (2014) Implants for orthodontic anchorage: success rates and reasons of failures. Implant dentistry 23 (2):155-161. doi:10.1097/ID.0000000000000048
 18. Chen YJ, Chang HH, Lin HY, Lai EH, Hung HC, Yao CC (2008) Stability of miniplates and miniscrews used for orthodontic anchorage: experience with 492 temporary anchorage devices. Clinical oral implants research 19 (11):1188-1196. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01571.x
 19. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annual review of immunology 17:701-738. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.701
 20. LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, Keegan AD, Garcia KC (2008) Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. Cell 132 (2):259-272. doi:10.1016/j.cell.2007.12.030
 21. Paul WE (1991) Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 77 (9):1859-1870
 22. Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A (2002) Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. Biochimica et biophysica acta 1592 (3):237-250
 23. te Velde AA, Huijbens RJ, Heije K, de Vries JE, Figdor CG (1990) Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. Blood 76 (7):1392-1397
 24. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA (1989) Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86 (10):3803-3807
 25. Nowzari H, Yi K, Chee W, Rich SK (2008) Immunology, microbiology, and virology following placement of NobelPerfect scalloped dental implants: analysis of a case series. Clinical implant dentistry and related research 10 (3):157-165. doi:10.1111/j.1708-8208.2007.00075.x
 26. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Mediators of inflammation 2014:561459. doi:10.1155/2014/561459

27. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM (2014) Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant dentistry* 23 (6):723-731. doi:10.1097/ID.0000000000000157
28. Koberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A (2016) Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Archives of toxicology*. doi:10.1007/s00204-016-1771-2
29. Belopolskaya OB, Smelaya TV, Moroz VV, Golubev AM, Salnikova LE (2015) Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients. *Clinical and experimental immunology* 180 (3):531-541. doi:10.1111/cei.12592
30. Wu Z, Qin W, Zeng J, Huang C, Lu Y, Li S (2015) Association Between IL-4 Polymorphisms and Risk of Liver Disease: An Updated Meta-Analysis. *Medicine* 94 (35):e1435. doi:10.1097/MD.0000000000001435
31. Qiu LJ, Ni J, Cen H, Wen PF, Zhang M, Liang Y, Pan HF, Mao C, Ye DQ (2015) Relationship between the IL-4 gene promoter -590C/T (rs2243250) polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 29 (1):48-55. doi:10.1111/jdv.12435
32. Kamei H, Onishi Y, Nakamura T, Ishigami M, Hamajima N (2016) Role of cytokine gene polymorphisms in acute and chronic kidney disease following liver transplantation. *Hepatology international*. doi:10.1007/s12072-016-9721-x
33. Bondurant KL, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Wolff RK, Slattey ML (2013) Interleukin genes and associations with colon and rectal cancer risk and overall survival. *International journal of cancer* 132 (4):905-915. doi:10.1002/ijc.27660
34. Patarcic I, Gelemanovic A, Kirin M, Kolcic I, Theodoratou E, Baillie KJ, de Jong MD, Rudan I, Campbell H, Polasek O (2015) The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis. *Scientific reports* 5:16119. doi:10.1038/srep16119
35. Hua L, Zuo XB, Bao YX, Liu QH, Li JY, Lv J, Fang DZ, Lin Q, Bao J, Ji RX (2016) Four-locus gene interaction between IL13, IL4, FCER1B, and ADRB2 for asthma in Chinese Han children. *Pediatric pulmonology* 51 (4):364-371. doi:10.1002/ppul.23322
36. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritzsche C, von Mutius E, Martinez FD (2003) A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112 (5):893-898. doi:10.1016/j.jaci.2003.08.033
37. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC (1992) A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Medical hypotheses* 39 (4):319-322
38. Trevilatto PC, Line SR (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology* 18 (1):6-9
39. Aidar M, Line SR (2007) A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian dental journal* 18 (2):148-152
40. Liu G, Wang Y, Wong L (2010) FastTagger: an efficient algorithm for genome-wide tag SNP selection using multi-marker linkage disequilibrium. *BMC bioinformatics* 11:66. doi:10.1186/1471-2105-11-66
41. Romano FL, Consolaro A (2015) Why are mini-implants lost: the value of the implantation technique! *Dental press journal of orthodontics* 20 (1):23-29. doi:10.1590/2176-9451.20.1.023-029.oin

42. Kuroda S, Sugawara Y, Deguchi T, Kyung HM, Takano-Yamamoto T (2007) Clinical use of miniscrew implants as orthodontic anchorage: success rates and postoperative discomfort. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 131 (1):9-15. doi:10.1016/j.ajodo.2005.02.032
43. Moon CH, Lee DG, Lee HS, Im JS, Baek SH (2008) Factors associated with the success rate of orthodontic miniscrews placed in the upper and lower posterior buccal region. *The Angle orthodontist* 78 (1):101-106. doi:10.2319/121706-515.1
44. Papageorgiou SN, Zogakis IP, Papadopoulos MA (2012) Failure rates and associated risk factors of orthodontic miniscrew implants: a meta-analysis. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 142 (5):577-595 e577. doi:10.1016/j.ajodo.2012.05.016
45. Yao CC, Chang HH, Chang JZ, Lai HH, Lu SC, Chen YJ (2015) Revisiting the stability of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 114 (11):1122-1128. doi:10.1016/j.jfma.2014.08.001
46. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (1):177-182. doi:10.1073/pnas.0126614100
47. Wilson TG, Jr., Nunn M (1999) The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *Journal of periodontology* 70 (7):724-729. doi:10.1902/jop.1999.70.7.724
48. Greenstein G, Hart TC (2002) A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 73 (2):231-247. doi:10.1902/jop.2002.73.2.231
49. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Jr., Higginbottom FL, Duff GW (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 24 (1):72-77
50. Qi H, Sun L, Jin YQ, Shen C, Chu P, Wang SF, Yin QQ, Qi Z, Xu F, Jiao WW, Wu XR, Tian JL, Xiao J, Shen AD (2014) rs2243268 and rs2243274 of Interleukin-4 (IL-4) gene are associated with reduced risk for extrapulmonary and severe tuberculosis in Chinese Han children. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 23:121-128. doi:10.1016/j.meegid.2014.01.031
51. Reif DM, McKinney BA, Motsinger AA, Chanock SJ, Edwards KM, Rock MT, Moore JH, Crowe JE (2008) Genetic basis for adverse events after smallpox vaccination. *The Journal of infectious diseases* 198 (1):16-22. doi:10.1086/588670

ANEXOS

Lista de abreviaturas e siglas

CEU	População descendente do Norte e Oeste da Europa
DL	Desequilíbrio de Ligação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
et al	e colaboradores
FAM	Frequência Alélica Mínima
Fig.	Figura
IC	Intervalo de Confiança
IL-1	Proteína Interleucina-1
<i>IL1β</i>	Gene da Interleucina-1 β
IL-1 β	Proteína Interleucina-1 β
<i>IL4</i>	Gene da Interleucina-4
IL-4	Proteína Interleucina-4
kb	Quilobase
M	Molar
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MI	Mini-Implante
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Th2	Linfócito T helper 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

Parecer do comitê de ética

 PUCPR	PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ Núcleo de Bioética Comitê de Ética em Pesquisa <i>Ciência com Consciência</i>	
PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA		
Parecer Nº 0004331/10		Protocolo CEP Nº 5693
Título do projeto ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E A SUSCEPTIBILIDADE À PERDA DE MINI-IMPLANTES PARA ANCORAGEM ORTODÔNTICA		Grupo
Protocolo CONEP 0216.0.084.000-10		Versão 2
Instituição PUCPR-CCBS - Curitiba		Pesquisador responsável Paula Cristina Trevilatto
Objetivos		
O objetivo do presente trabalho é investigar a associação entre alelos e genótipos de polimorfismos no gene da receptora da vitamina D VDR e a susceptibilidade à perda de mini-implantes para a ancoragem ortodôntica. Objetivos específicos a) Espera-se encontrar associação entre polimorfismos nos genes do VDR e a perda de mini-implantes		
Comentários e considerações		
A amostra será composta por dois grupos: (1) grupo controle, constituído de 100 pacientes apresentando um ou mais mini-implantes saudáveis e (2) grupo teste, consistindo de 100 pacientes, acima de 18 anos, que apresentam perda de mini-implantes. Os grupos serão pareados de acordo com idade, gênero, etnia e área de colocação do mini-implante. Os indivíduos de ambos os grupos serão selecionados do universo de pacientes tratados no Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO) da Neodent® Implante Osteointegrável.		
Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.		
Adequado conforme Res. 196/96 MS e Res. 340/04 MS.		
Conclusões		
Aprovado sob quesito ético. Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: 06/10/2010, manifesta-se por considerar o projeto Aprovado.		
Situação Aprovado		
Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.		
Curitiba, 06 de Outubro de 2010.		
Prof. MSc. Naim Akel Filho Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa PUC PR		

Normas para publicação

CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS

TITLE PAGE

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author.

ABSTRACT

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Objectives (stating the main purposes and research question)
- Materials and Methods
- Results
- Conclusions
- Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

KEYWORDS

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format.

HEADINGS

Please use no more than three levels of displayed headings.

ABBREVIATIONS

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

FOOTNOTES

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

REFERENCES

CITATION

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

REFERENCE LIST

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see: [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

FIGURES

FIGURE NUMBERING

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

FIGURE CAPTIONS

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.