



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
INTEGRADA - ÊNFASE EM ORTODONTIA

LAÍS CRISTINA GIACOBBO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *OPG*
COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS

Curitiba

2018

LAÍS CRISTINA GIACOBBO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *OPG*
COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS**

**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 Clínica Odontológica
Integrada - Ênfase em Ortodontia**

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

Curitiba

2018

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

G429e
2018

Giacobbo, Laís Cristina
Estudo de associação de polimorfismos no gene *OPG* com a perda de mini-implantes ortodônticos / Laís Cristina Giacobbo ; orientadora: Paula Cristina Trevilatto. – 2018.
58 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2018
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Polimorfismos (Genética). I. Trevilatto, Paula Cristina.
II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

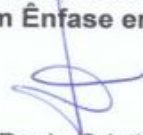
CDD 20. ed. – 617.643

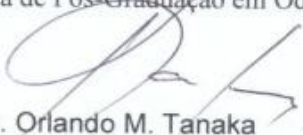
TERMO DE APROVAÇÃO

LAÍS CRISTINA GIACOBBO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *OPG* COM A
PERDA DE MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS**

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 **Clínica Odontológica Integrada com Ênfase em Ortodontia**.

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


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


Profª Drª Isabela Almeida Shimizu
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, ILAPEO

Curitiba, 08 de novembro de 2018.

Dedicatória

Aos meus pais, Leoni Rodrigues Giacobbo e Hilário Valdir Giacobbo (*in memoriam*).

Meus grandes incentivadores e que nunca mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos. Meu pai, meu anjinho e meu herói. Levarei seu exemplo por toda a vida e prometo te orgulhar a cada dia. Minha mãe, que mesmo frente todas as dificuldades, me proporcionou estar aqui hoje. Sem vocês, eu não conseguiria.

Minha eterna gratidão, amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto. Pela orientação, tempo, paciência e principalmente, por confiar em mim para realização desse trabalho. Você é um exemplo de profissional com toda educação, amizade e carinho com que trata seus alunos. Sou muito grata por poder ter tido a honra de ser sua orientada. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter guiado meus passos e derramado suas bênçãos sobre mim para que eu chegasse até aqui. “Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e Ele, tudo fará”.

À minha querida e doce irmã, Heloíse Angélica Giacobbo, que mesmo longe, sei o quanto torce por mim. Obrigada por ser a melhor irmã que eu poderia ter.

Ao meu namorado, Ernani Schenfert Filho, por todo apoio, paciência e por sempre estar ao meu lado.

À minha querida e amada amiga, Maria Augusta Andrigo Perin, por ter sido minha dupla e grande parceira em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Bruno Castilhos, por todo conhecimento compartilhado nas intermináveis sextas-feiras que passamos no laboratório. Agradeço pela paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Reichow, por ter coletado e disponibilizado a amostra de mini-implantes para que muitas pesquisas pudessem ser realizadas.

Ao admirável Prof. Dr. Alexandre Vieira, por toda contribuição durante a qualificação.

À Thais Munhoz Pereira, por toda disposição, paciência e orientação na confecção da análise estatística. Obrigada por todo carinho.

Às companheiras da genética, Valéria Kruchelski Huk e Rita de Cássia Broker, por toda ajuda e incentivo desde o início do Mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Renata Iani Werneck, seu apoio foi fundamental para meu ingresso no Mestrado. Sou imensamente grata.

À Irenice Cairo da Silva, por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso durante os dias que passei no laboratório de Imunogenética.

À querida Laysa Toschi Martins, vizinha de laboratório, pelo grande auxílio nos momentos de dúvidas.

Aos demais colaboradores do laboratório de Imunogenética, sem vocês a parte laboratorial não teria sido possível.

À Faculdade do Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO) e colaboradores, pela grande parceria para que este trabalho pudesse ser realizado.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Luciana Azevedo Alanis e Simone Tetu Moysés, pelo carinho e contribuição durante os Seminários no decorrer do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, por sempre acreditar em mim e por estar

ao meu lado em mais essa conquista. Obrigada tudo que já me ensinou e ainda me ensina.

À Prof^a. Dr^a. Elisa Souza Camargo, por todo amor e carinho com que trata seus alunos. Seu apoio foi essencial na minha formação.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela amizade e conhecimento compartilhado nesses anos de Ortodontia.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), por toda dedicação com o programa.

Aos meus colegas de turma que estiveram ao meu lado todo esse tempo. Adriano Kuczynski, Ahmad Allaham, Ana Carolina Mastriani Arantes, Caio Seiti Miyoshi, Carlos Novakowski, Layza Rossatto Oppitz, Luana Lazarotto, Maria Augusta Andriago Perin e Paula Bubadra. Sempre levarei comigo essa turma querida e especial.

Aos colegas Doutorandos da ênfase em Ortodontia, Lara Karolina Guimarães, Neblyssa Schneider Silveira, Oscar Mario Antelo e Thiago Martins Meira, pelo companheirismo construído nesse tempo que estivemos juntos.

Aos demais colegas do PPGO, pela parceria e amizade.

Aos pacientes que se dispuseram a participar desse trabalho incrível, minha gratidão.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade e por sempre me acolher desde a época da graduação.

À Neide Reis Borges, secretária do PPGO, pela eficiência, alegria e amizade.

*“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que
realmente importa.”*

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
Página título	1
Resumo.....	2
Introdução	3
Objetivos	6
Material e Métodos.....	7
Resultados	10
Discussão	17
Conclusões.....	20
Referências.....	21
ARTIGO EM INGLÊS.....	27
Title page.....	27
Abstract	28
Introduction	29
Material and Methods.....	32
Results	35
Discussion.....	42
Conclusions	45
References.....	46
ANEXOS.....	52
Lista de abreviaturas e siglas.....	52
Parecer de comitê de ética.....	54
Normas para publicação – American Journal Of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics.....	55

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Página título

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *OPG* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES ORTODÔNTICOS

Laís Cristina Giacobbo

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO), Ortodontia

Email: laisgiacobbo@hotmail.com

Correspondência: Paula Cristina Trevilatto. Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho. Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80215-901. Telefone: +55 (41) 3271-1637, email: paula.trevilatto@pucpr.br

RESUMO

Objetivo: Investigar a associação de polimorfismos genéticos do tipo *tag*SNPs do gene Osteoprotegerina (*OPG*) com a perda de mini-implantes ortodônticos.

Materiais e métodos: A amostra foi constituída por 135 pacientes de ambos os sexos, com média de idade de $48,7 \pm 10$ (20 a 76 anos). O grupo controle foi composto por 104 pacientes, sem nenhum mini-implante perdido e em função por pelo menos 6 meses e o grupo caso, por 31 pacientes com pelo menos 1 mini-implante perdido. As células foram obtidas através de bochecho com solução de glicose à 3% durante 1 minuto e raspagem da mucosa bucal com espátula esterilizada. O DNA foi extraído a partir de células epiteliais bucais e acetato de amônio a 10 M e EDTA 1 mM e a análise dos polimorfismos do gene *OPG*, realizada pela técnica da PCR em Tempo Real. Análises univariada e multivariada foram efetuadas ($p < 0,05$). **Resultados:** Considerando os polimorfismos do gene *OPG*, o alelo T do rs11573938 (modelo dominante para o alelo T; CC vs CT+TT), mostrou-se associado com a perda mini-implantes ($p = 0,049$). Após a análise multivariada, a variável que se manteve associada foi a quantidade de mini-implantes instalados. **Conclusão:** Apenas o número de mini-implantes instalados associou-se à perda de mini-implantes ortodônticos após a análise multivariada. Os resultados aqui apresentados fortalecem o conceito de interação entre aspectos clínicos e genéticos, que juntos aumentam o risco na modulação da suscetibilidade a doenças complexas.

<i>Palavras-chave:</i> polimorfismos genéticos, <i>OPG</i> , mini-implante, perda de mini-implantes

INTRODUÇÃO

Ancoragem Ortodôntica

Ancoragem ortodôntica pode ser definida como a resistência aos movimentos dentários indesejados.^{1,2} Sendo assim, ter um bom controle de ancoragem, é essencial para o sucesso do tratamento ortodôntico.^{2,3} Contudo, garantir essa ancoragem adequada, é muitas vezes, um desafio na Ortodontia Ortopedia Dentofacial.⁴

Ao longo do século XX, o aparelho extrabucal foi apontado como sendo o “padrão ouro” para o reforço de ancoragem, no entanto, é frequentemente associado com problemas de cooperação por parte dos pacientes. Dessa forma, consequentemente, ocorre perda de ancoragem.⁵ Por esses motivos, a crescente busca por mínima colaboração e, ao mesmo tempo, efeitos corretivos máximos, fizeram dos dispositivos de ancoragem temporária (DATs), uma excelente alternativa para a tradicional ancoragem ortodôntica,⁶ pois tornaram a mecânica mais simples e eficaz que as técnicas convencionais.⁷

Nos últimos anos, os mini-implantes (MIs) ganharam enorme popularidade no meio ortodôntico⁸ e tornaram-se um método confiável para fornecer ancoragem ortodôntica temporária.⁹ Seu uso possibilita que o movimento seja realizado sem efeito colateral nos outros dentes,¹⁰ além de ser um mecanismo geralmente bem aceito pelos pacientes,^{11,12} devido à sua simplicidade na instalação e remoção, baixo custo, e possibilidade de carga imediata após a instalação,¹³ podendo ser utilizados em vários locais devido a seu tamanho reduzido, além de ser um procedimento minimamente traumático.²

A média de sucesso dos MIs é relatada como sendo de aproximadamente 84%.¹⁴ Seu sucesso depende de alguns fatores, como tipo, diâmetro e comprimento do mini-implante (MI),¹ mecânica ortodôntica, habilidade do cirurgião-dentista,^{1,10} espessura do osso do hospedeiro,¹ higiene bucal,^{1,10} presença de inflamação dos tecidos moles circundantes ao MI^{2,10} e fatores genéticos.² Além disso, também pode ser necessário algum grau de osseointegração¹⁵ e para que isso ocorra, uma cicatrização primária em torno da superfície MI-osso deve ocorrer.⁶ Essa estabilidade primária, envolve o contato direto entre o mini-implante

e o osso e é um sinal importante para uma inserção bem-sucedida, pois os casos de falha, ocorrem durante os estágios iniciais após tal procedimento.¹⁶

Sistema RANK/RANKL/OPG

O osso é um tecido dinâmico, que constantemente passa por um processo de renovação e reparo, denominado de remodelação óssea. Esse, é um processo fisiológico essencial no tecido ósseo em humanos saudáveis,¹⁷ que envolve a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a síntese da matriz óssea pelos osteoblastos.¹⁸

O eixo RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa beta), RANKL (receptor ativador ligante do fator nuclear kappa beta) e OPG (osteoprotegerina), está envolvido na remodelação óssea e regula a diferenciação e ativação dos osteoclastos. Portanto, existe um equilíbrio crucial entre a formação óssea e a reabsorção óssea.¹⁹ À vista disso, esse sistema tem sido descrito como um regulador central do metabolismo ósseo.²⁰

O RANKL mostrou ligar-se ao seu receptor RANK, em células da família dos osteoclastos para induzir a osteoclastogênese. A molécula RANKL, bloqueada pelo receptor solúvel OPG, foi identificada como mediadora chave da osteoclastogênese, tanto ligada à membrana de células pré-osteoblásticas e células do estroma, como na forma solúvel.²⁰ Portanto, a OPG atua como um receptor chamariz, regulando essa interação e concorrendo com o RANK, impedindo as interações RANK-RANKL.²¹ Dessa forma, os efeitos catabólicos do RANKL são minimizados pela OPG, que se liga ao RANKL, evitando a ativação do receptor RANK²² e, conseqüentemente, reduzindo a reabsorção óssea.²³

Reconhecida pela primeira vez em 1977,²¹ a OPG foi a primeira molécula identificada no eixo RANK/RANKL/OPG.²⁴ É uma citocina, pertencente à família do receptor do fator de necrose tumoral 11B (TNFRSF11B)^{19,21,23} e foi denominada de OPG, devido ao seu efeito mais bem caracterizado: proteção óssea.^{21,25}

A OPG é expressa em múltiplos órgãos e células, incluindo coração, pulmão, estômago, fígado, rim, baço, intestino, pele, timo, nódulos linfáticos, medula óssea, osteoblastos, células musculares lisas vasculares, células

dendríticas, linfócitos B, condrócitos articulares, glândula tireoide, medula espinhal e cérebro.²⁵

O gene *OPG*

A OPG é codificada por um gene (*OPG*), que está localizado no braço longo do cromossomo 8, na posição 24 (8q24)^{26,27} e é formada por cinco éxons,^{21,28} além de abranger 29 kb do genoma humano.²⁸ No seu aspecto bioquímico, é uma glicoproteína solúvel, sintetizada a partir de 401 aminoácidos,^{21,29} com massa molecular de 60 kDa.²¹

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são as formas mais comuns de variação do DNA,³⁰ podendo ser encontrados tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras no gene, ou entre os genes.³¹ Representam a substituição de um único nucleotídeo, por exemplo, uma adenina (A), substituída por uma das outras três bases nitrogenadas: timina (T), citosina (C) ou guanina (G),³² gerando alelos comuns na população.³³

SNPs são marcadores de escolha na análise genética,³¹ pois podem conferir suscetibilidade ou modulação protetora contra doenças complexas,³⁴ podendo afetar a quantidade ou função de proteínas expressas.³⁰ Assim, investigar SNPs no genoma humano, pode proporcionar avanços em novos alvos terapêuticos.³¹

É de extrema importância a determinação dos fatores sistêmicos diretos e indiretos que ocasionam a resposta do hospedeiro, para se identificar grupos de risco ao desenvolvimento de respostas patológicas indesejáveis. Assim, a procura de marcadores genéticos que possibilitem identificar indivíduos mais propensos à perda de MIs, é fundamental para prevenir a instalação do processo destrutivo.

Nos últimos anos, muitos fatores clínicos relacionados ao sucesso de MIs foram estudados amplamente. Contudo, até o momento, existe apenas um estudo investigando a associação de perda de MIs com fatores genéticos, no qual o gene candidato investigado foi o gene *IL-6*.²

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a associação de polimorfismos no gene *OPG* com a suscetibilidade à perda de mini-implantes para ancoragem ortodôntica em uma amostra de pacientes da cidade de Curitiba-PR/Brasil.

Objetivos Específicos

- a) Analisar a associação dos *tag*SNPS do gene *OPG* com a perda de mini-implantes.
- b) Definir os *bins* (blocos de alto desequilíbrio de ligação) do gene *OPG*.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de Estudo

Este estudo transversal é baseado em populações caso-controle. Foram analisados 487 prontuários da Faculdade Latino Americana de Pesquisa e Ensino Odontológico (ILAPEO), localizado em Curitiba, Paraná, entre 2004 a 2010. Destes, 148 pacientes foram incluídos no estudo por terem sido tratados com mini-implantes ortodônticos (NEODENT® *Implante Osseointegrável*). Oito pacientes foram excluídos por apresentarem sífilis, gravidez ou lactação e cinco se recusaram a participar. Dessa forma, o estudo foi elaborado com um grupo de 135 pacientes de ambos os sexos, com faixa etária entre 20 e 76 anos (média de idade de $48,7 \pm 10$). O grupo controle, foi composto por 104 pacientes sem nenhum MI perdido em função por pelo menos 6 meses, e o grupo caso, constituiu-se de 31 pacientes, que apresentaram pelo menos 1 MI perdido.

Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O número de MIs instalados e perdidos foi verificado na ficha clínica dos pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, protocolo 5693/10.

Coleta e Purificação do DNA

Células foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose 3% durante 1 minuto e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada.³⁵ Após isso, a ponta da espátula foi agitada dentro da solução de bochecho. As células epiteliais orais foram sedimentadas por centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspenso em 1.300 µl de tampão de extração [10 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM de EDTA, 0,5% de SDS]. Foram adicionados à solução 10 µl de proteinase K (20 mg/ml), deixada durante a noite a 65°C. O DNA foi purificado por adição de acetato de amônio 10 M, precipitado com isopropanol e ressuspenso com 50 µl de solução de extração [Tris 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1 mM].³⁶

Análise dos *tag*SNPs do gene *OPG*

SNPs próximos, 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 chamados *tag*SNPs. A estratégia de genotipar *tag*SNPs tem como propósito encontrar informação de um gene inteiro, reduzindo os custos e o tempo. Genotipar *tag*SNPs exclui a necessidade de genotipar todos os SNPs de um determinado gene. Assim, *tag*SNPs do gene *OPG* foram selecionados de acordo com informações disponíveis no *International HapMap Project*, release 24 (www.hapmap.org).

Todos os 12 marcadores selecionados apresentaram frequência alélica mínima (FAM) de 0,05 na população CEU (descendentes do Norte e Oeste da Europa). O parâmetro de corte para definir o DL entre dois marcadores foi um logaritmo multimarcador de $r^2 > 0,8$, considerado um alto nível de DL. Seguindo esses critérios, os seguintes *tag*SNPs foram selecionados:

OPG: rs11573938, rs3102724, rs11573884, rs2875845, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267, rs11573901.

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 Max Mister* (*Applied Biosystems*). Foi utilizado o controle negativo em todas as genotipagens realizadas.

Três polimorfismos *tag*SNPs não foram amplificados, possivelmente por desenho inapropriado dos *primers*, sendo os rs11573856, rs7010267 e rs11573901 desconsiderados da análise.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS, versão 20.0, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o mapa de desequilíbrio de ligação entre os SNPs, obtidos no Haploview 4.1.

Variáveis nominais foram expressas como frequência e porcentagem. Os testes qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher foram utilizados para testar

diferenças entre os grupos para variáveis categóricas. Os seguintes modelos genéticos foram analisados: dominante e recessivo, avaliados pelo teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. O modelo aditivo, avaliado por regressão logística binária.

Para a análise multivariada, o modelo de regressão logística binária foi utilizado, incluindo variáveis independentes que obtiveram valores de $p < 0,20$ na análise univariada. Resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

As estimativas de risco foram acessadas por cálculo de *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

RESULTADOS

Parâmetros Clínicos e Sociodemográficos

A taxa de sucesso dos mini-implantes ortodônticos foi de 87,5%.

Os resultados relativos às variáveis clínicas e sociodemográficas da amostra do presente estudo foram publicados por Reichow et al.,² e estão resumidos nas tabelas I e II.

Tabela I. Resultados da análise univariada, considerando as variáveis clínicas e sociodemográficas para os grupos controle e caso (n=135).

Dados dos pacientes	Grupo Controle n=104 %		Grupo Caso n=31 %		Valor de p	OR (IC 95%)
Gênero						
Masculino	29	27,9	7	22,6	0,648*	1,33 (0,52 - 3,41)
Feminino	75	72,1	24	77,4		
Idade	48,69 ± 10,31		48,77 ± 9,11		0,968 ^t	
Hábitos de Fumo	26	25,0	12	38,7	0,172*	1,89 (0,81 - 4,42)
Hábitos de Higiene						
Escovação diária mais de 3 vezes	90	86,5	24	77,4	0,260*	0,53 (0,19 - 1,47)
Uso de fio dental	97	93,3	28	90,3	0,696*	0,67 (0,16 - 2,78)
Enxaguatório bucal	98	94,2	30	96,8	1,000*	1,84 (0,21 - 15,87)
CPOD						
Até 10	8	7,7	2	6,5	1,000*	1,21 (0,24 - 6,01)
Mais que 10	96	92,3	29	93,5		
CPITN						
zero	66	63,5	17	54,8	0,407*	1,43 (0,63 - 3,22)
1, 2 e 3	38	36,5	14	45,2		
Número de mini-implantes instalados por paciente						
Até 1	27	26,0	0	0,0	0,001*	
Mais que 1	77	74,0	31	100,0		

*Teste Exato de Fischer

^tTeste T de Student

CPOD, Dentes cariados, perdidos e obturados

CPITN, Índice comunitário de necessidade de tratamento periodontal

Fonte: Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. Int J Oral Maxillofac Surg 2016;45:649-657.

Tabela II. Resultados da análise univariada, considerando as variáveis dos mini-implantes ortodônticos (n=311).

Dados MI	Grupo Controle		Grupo Caso		Valor de p	OR (IC 95%)
	n=272	%	n=39	%		
Local de instalação	269	98,90	39	100,00		
Maxila	151	91,52	14	8,48	0,025**	2,29 (1,14 - 4,49)
Mandíbula	118	82,52	25	17,48		
Posição de instalação	269	98,90	39	100,00		
Vestibular	196	87,11	29	12,89		
Lingual	42	89,36	5	10,64	0,890*	
Crista alveolar	31	86,11	5	14,89		
Diâmetro (mm)[§]	272	100,00	39	100,00		
1,3	36	85,71	6	14,29	0,802**	
1,6/2,0	236	87,73	33	12,27		
Comprimento (mm)[£]	272	100,00	39	100,00		
5	9	90,00	1	10,00		
7	145	86,83	22	13,17	0,948*	
9	82	87,23	12	12,77		
11	36	90,00	4	10,00		
Tipo de cinta^{&}	272	100,00	39	100,00		
CB (cinta baixa)	116	89,92	13	10,08		
CM (cinta média)	125	85,62	21	14,38	0,542*	
CA (cinta alta)	31	86,11	5	13,89		
Tipo de ancoragem	220	80,88	31	79,49		
Direta	177	88,50	23	11,50	0,474**	
Indireta	43	84,31	8	15,69		
Tipo de movimento	233	85,66	35	89,74		
Intrusão	123	90,44	13	9,56		
Verticalização	54	79,41	14	20,59	0,109*	
Mesialização	17	80,95	4	19,05		
Distalização	39	90,70	4	9,30		

*Teste Qui-quadrado de Pearson

**Teste exato de Fischer

[§]Diâmetro de 1,6mm foi usado em 85% dos casos, 1,3mm em 13,50% e 2,0mm em 0,64%

[£]Comprimento de 5mm foi usado em 2,89% dos casos, 7mm em 53,70%, 9mm em 30,23% e 11mm em 11,57%

Fonte: Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. Int J Oral Maxillofac Surg 2016;45:649-657.

Análise de Polimorfismos no Gene *OPG*

A distribuição de genótipos do gene *OPG* apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle. Os *tag*SNPs rs102724 e rs3134057 estão em alto DL ($r^2=89\%$). O mapeamento físico completo de DL do gene *OPG* para a população estudada pode ser verificado na figura 1.

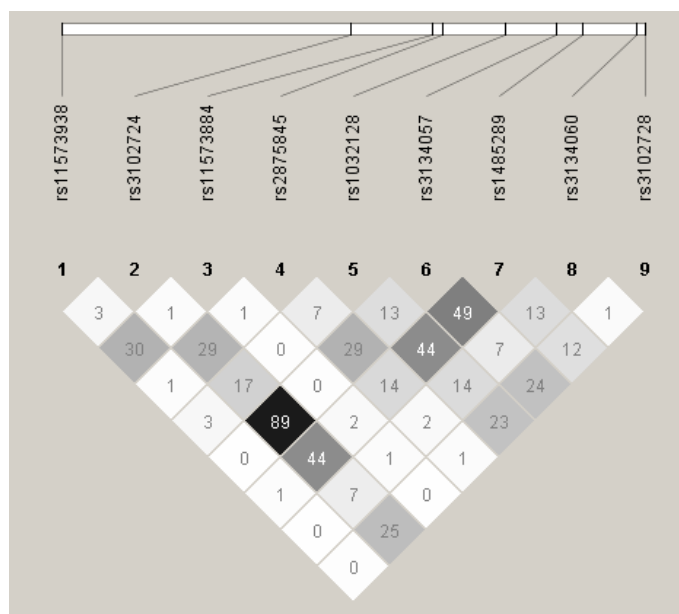


Figura 1. Mapa de desequilíbrio de ligação (DL) dos *tag*SNPs selecionados do gene *OPG* na população estudada. O número dentro dos quadrados indica a proporção em % de DL. A intensidade da cor dentro dos quadrados reflete o grau de DL entre dois *loci*: a intensidade mais escura representa maior grau de DL entre os SNPs.

O alelo T do rs11573938 (modelo dominante para o alelo T; CC vs CT+TT), mostrou-se associado com a perda de mini-implantes ortodônticos ($p=0,049$), (Tabela III). O restante dos *tag*SNPs (rs3102724, rs11573884, rs2875845, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267, rs11573901) não apresentou associação com a perda de MIs, nem no sentido de suscetibilidade (predisposição) nem no sentido de proteção em nenhum dos modelos genéticos estudados (Tabelas III e IV).

Tabela III. Resultados da análise univariada dos *tag*SNPs do gene *OPG* para os modelos dominante e recessivo para os grupos controle e caso (n=135).

<i>Tag</i> SNPS dbSNP ID ^a	Alleles 1/2 ^{&}	Grupos	Genótipos	Genótipos	Valor de p	OR (IC 95%)
rs1032128 - Dom G n=133	[G/A]	Controle n (%)	GG + AG 90 (87,4)	AA 13 (12,6)	0,190**	0,239 (0,030 - 1,904)
		Caso n (%)	29 (96,7)	1 (3,3)		
rs1032128 - Rec G n=133	[G/A]	Controle n (%)	AG + AA 51 (49,5)	GG 52 (50,5)	0,214*	1,694 (0,734 - 3,912)
		Caso n (%)	11 (36,7)	19 (63,3)		
rs1485289 - Dom G n=126	[G/A]	Controle n (%)	GG + AG 67 (69,8)	AA 29 (30,2)	0,145*	0,462 (0,161 - 1,326)
		Caso n (%)	25 (83,3)	5 (16,7)		
rs1485289 - Rec G n=126	[G/A]	Controle n (%)	AG + AA 70 (72,9)	GG 26 (27,1)	0,756*	1,154 (0,468 - 2,842)
		Caso n (%)	21 (70,0)	9 (30,0)		
rs 2875845 - Dom A n=134	[A/G]	Controle n (%)	AA + AG 102 (98,1)	GG 2 (1,9)	0,536**	1,759 (0,154 - 20,089)
		Caso n (%)	29 (96,7)	1 (3,3)		
rs 2875845 - Rec A n=134	[A/G]	Controle n (%)	AG + GG 26 (25,0)	AA 78 (75,0)	0,571*	1,333 (0,491 - 3,619)
		Caso n (%)	6 (20,0)	24 (80,0)		
rs 3102728 - Dom T n=135	[T/C]	Controle n (%)	TT + CT 94 (98,9)	CC 1 (1,1)	1,000**	-
		Caso n (%)	24 (100,0)	0 (0,0)		
rs 3102728 - Rec T n=135	[T/C]	Controle n (%)	CT + CC 19 (20,0)	TT 76 (80,0)	0,560**	1,750 (0,472 - 6,486)
		Caso n (%)	3 (12,5)	21 (87,5)		
rs 3134057 - Dom A n=134	[A/G]	Controle n (%)	AA + AG 91 (88,3)	GG 12 (11,7)	1,000**	0,813 (0,214 - 3,85)
		Caso n (%)	28 (90,3)	3 (9,7)		
rs 3134057 - Rec A n=134	[A/G]	Controle n (%)	AG + GG 57 (55,3)	AA 46 (44,7)	0,961*	1,020 (0,455 - 2,287)
		Caso n (%)	17 (54,8)	14 (45,2)		
rs 3134060 - Dom A n=131	[A/G]	Controle n (%)	AA + AG 100 (99,0)	GG 1 (1,0)	1,000**	-
		Caso n (%)	30 (100,0)	0 (0,0)		
rs 3134060 - Rec A n=131	[A/G]	Controle n (%)	AG + GG 25 (24,8)	AA 76 (75,2)	0,591*	1,316 (0,483 - 3,585)
		Caso n (%)	6 (20,0)	24 (80,0)		

rs 11573884 - Dom G n=128	[G/C]	Controle n (%) Caso n (%)	94 (94,9) 28 (96,6)	5 (5,1) 1 (3,4)	1,000**	0,671 (0,075 - 5,988)
rs 11573884 - Rec G n=128	[G/C]	Controle n (%) Caso n (%)	CG + CC 12 (12,1) 5 (17,2)	GG 87 (87,9) 24 (82,8)	0,475*	0,662 (0,212 - 2,064)
rs 11573938 - Dom C n=135	[C/T]	Controle n (%) Caso n (%)	CC + CT 103 (99,0) 31 (100,0)	TT 1 (1,0) 0 (0,0)	1,000**	-
rs 11573938 - Rec C n=135	[C/T]	Controle n (%) Caso n (%)	CT + TT 12 (11,5) 8 (25,8)	CC 92 (88,5) 23 (74,2)	0,049*	0,375 (0,137 - 1,000)
rs 3102724 - Dom G n=134	[G/A]	Controle n (%) Caso n (%)	GG + AG 93 (89,4) 27 (90,0)	AA 11 (10,6) 3 (10,0)	1,000**	0,939 (0,244 - 3,611)
rs 3102724 - Rec G n=134	[G/A]	Controle n (%) Caso n (%)	AG + AA 55 (52,9) 15 (50,0)	GG 49 (47,1) 15 (50,0)	0,781*	1,122 (0,498 - 2,530)

^aIdentificador de SNP baseado no dbSNP do NCBI

[&]O alelo 1 é o mais frequente no grupo caso

*Qui-quadrado de Pearson

**Teste Exato de Fisher

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confiança

Tabela IV. Resultado da análise univariada dos *tag*SNPs do gene *OPG* para o modelo aditivo para os grupos controle e caso (n=135).

<i>Tag</i> SNPs dbSNP ID ^a	Alelos ^{&}	Genótipos	Grupo Controle n (%)	Grupo Caso n (%)	Valor de <i>p</i> [*]	OR (IC 95%)
rs1032128 n=133	[G/A]	GG	52 (50,5)	19 (63,3)	0,303	
		AG	38 (36,9)	10 (33,3)	0,146	4,750 (0,581 - 38,817)
		AA	13 (12,6)	1 (3,3)	0,262	3,421 (0,399 - 29,367)
rs1485289 n=126	[G/A]	GG	26 (27,1)	9 (30,0)	0,346	
		AG	41 (42,7)	16 (53,3)	0,261	2,008 (0,596 - 6,764)
		AA	29 (30,2)	5 (16,7)	0,150	2,263 (0,745 - 6,876)
rs2875845 n=134	[A/G]	AA	78 (75,0)	24 (80,0)	0,700	
		AG	24 (23,1)	5 (16,5)	0,697	0,615 (0,053 - 7,086)
		GG	2 (1,9)	1 (3,3)	0,507	0,417 (0,031 - 5,535)
rs3102728 n=135	[T/C]	TT	76 (80,0)	21 (87,5)	0,753	
		CT	18 (18,9)	3 (12,5)	1	-
		CC	1 (1,1)	0 (0,0)	1	
rs3134057 n=134	[A/G]	AA	46 (44,7)	14 (45,2)	0,953	
		AG	45 (43,7)	14 (45,2)	0,783	1,217 (0,300 - 4,934)
		GG	12 (11,7)	3 (9,7)	0,76	1,244 (0,307 - 5,047)
rs3134060 n=131	[A/G]	AA	76 (75,2)	24 (80,0)	0,902	
		AG	24 (23,8)	6 (20,0)	1	-
		GG	1 (1,0)	0 (0,0)	1	
rs11573884 n=128	[G/C]	GG	87 (87,9)	24 (82,8)	0,516	
		CG	7 (7,1)	4 (13,8)	0,774	1,379 (0,154 - 12,375)
		CC	51 (3,9)	1 (3,4)	0,406	2,857 (0,241 - 33,902)
rs11573938 n=135	[C/T]	CC	92 (88,5)	23 (74,2)	0,121	
		CT	11 (10,6)	8 (25,8)	1	-
		TT	1 (1,0)	0 (0,0)	1	
rs3102724 n=134	[G/A]	GG	49 (47,1)	15 (50,0)	0,962	
		AG	44 (42,3)	12 (40,0)	0,872	1,122 (0,276 - 4,559)
		AA	11 (10,6)	3 (10,0)	1	1,000 (0,240 - 4,167)

^aIdentificador de SNP baseado no dbSNP do NCBI

[&]O alelo 1 é o mais frequente no grupo caso

^{*}Regressão logística binária

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confiança

Análise Multivariada

A análise multivariada é uma ferramenta utilizada para estudar o comportamento de múltiplas variáveis simultaneamente. No caso específico, foram consideradas as variáveis que obtiveram um valor de $p < 0,20$ na análise univariada, que foram: número de mini-implantes instalados por paciente ($p=0,001$) e hábitos de fumo ($p=0,172$) (Tabela I).

No gene *OPG*, o rs1032128 no modelo dominante para o alelo G: $p=0,190$ e no modelo aditivo: $p=0,146$; o rs1485289 no modelo dominante para o alelo G: $p=0,145$ e no modelo aditivo: $p=0,15$, e o rs11573938 no modelo dominante T para o alelo T: $p=0,049$ e no modelo aditivo: $p=0,121$.

O número de mini-implantes instalados por paciente (Resultado publicado por Reichow et al.,²) foi a única variável que se manteve associada com a perda de mini-implantes ortodônticos, após a análise multivariada ($p=0,000$), mostrando um aumento do risco em mais de 14 vezes, na presença dos alelos citados acima (Tabela V).

Tabela V. Resultado da análise multivariada para os grupos controle e caso.

Dados Gerais	Grupo Controle		Grupo Caso		Valor de p^*	OR (IC 95%)
	n= 104	%	n=31	%		
Número de MIs instalados por paciente						
1 ou 2	84	80,8	7	22,6	0,000	14,400 (5,443 - 38,099)
3, 4 ou 5	20	19,2	24	77,4		

*Regressão logística binária

OR: Odds Ratio

IC: Intervalo de Confiança

DISCUSSÃO

Os mini-implantes tornaram-se muito populares entre os ortodontistas, principalmente porque são dispositivos muito efetivos em tratamentos ortodônticos com alta demanda de ancoragem.³⁷ A taxa de sucesso dos mini-implantes da amostra estudada (publicada no estudo de Reichow et al.²) foi de 87,5%, muito semelhante a outros artigos encontrados na literatura, que relataram a taxa de sucesso como sendo superior a 80%.^{14,38,39}

Entretanto, os mini-implantes por vezes falham. Albogha et al.,³⁹ relataram a taxa de perda de MIs como sendo entre 13,4% e 20,1%.

Em vista disso, tem sido referido que os riscos de falha são maiores em pacientes mais jovens, com idade inferior a 20 anos, em comparação aos mais velhos (>20 anos).⁴ Isso ocorre, possivelmente, devido ao metabolismo ósseo ativo e baixa maturação dos ossos do complexo maxilo-mandibular em crianças em fase de crescimento.⁴⁰ Por conseguinte, isso poderia explicar a alta taxa de sucesso alcançada no estudo de Reichow et al.,² no qual os pacientes possuíam idade entre 20 e 76 anos.

Além disso, o número de mini-implantes instalados, mostrou-se associado à perda de MIs.² Isso pode ser explicado, devido a condições anatômicas que poderiam influir no ângulo de instalação e na incidência de forças mecânicas, ou pelo aumento de inflamação, juntamente com o trauma cirúrgico, que poderia reduzir a permanência dos MIs.² Fatores mecânicos, como o tamanho e o design dos MIs, também podem interferir na sua estabilidade. Posto isso, Romano et al.,⁴¹ relataram que na presença de estruturas anatômicas importantes, o tamanho ideal de mini-implante para cada local deve ser utilizado, sempre considerando uma margem de segurança adicional. Assim sendo, dispositivos mais longos, de 8 a 9 mm são recomendados para a região posterior, enquanto que os mais curtos, de 6 a 7 mm, para a região anterior superior e inferior.

Outro fator associado à perda de MIs, foi o local de instalação, onde a maior prevalência de perdas verificou-se na mandíbula, quando comparada com a maxila.² A densidade óssea da mandíbula é alta e isso requer maior torque de inserção, causando superaquecimento e consequentemente dano ósseo, o que diminui a taxa de sobrevivência dos mini-implantes.⁶ Esses resultados, corroboram

com vários outros estudos, que suportam a hipótese de que a taxa de sucesso dos mini-implantes inseridos na maxila, são de fato maiores do que na mandíbula.^{40,42,43}

Todavia, se o MI falhar por algum motivo, existem duas opções: reinstalar um novo na mesma área após 4 a 6 semanas ou instalar um novo em uma área adjacente imediatamente.⁴⁴ O fato é que muitos autores buscam explicar esse fracasso³⁹ de origem multifatorial.^{2,4}

A OPG é uma citocina essencial para a osteoclastogênese, pois é muito eficaz no processo de remodelação óssea.⁴⁵ Estudos têm associado polimorfismos no gene *OPG* com a densidade mineral óssea, turnover ósseo, osteonecrose induzida por bifosfonatos na mandíbula, espondilite anquilosante, osteoporose, artropatia de Charcot, câncer de mama,⁴⁶ periodontite⁴⁷ e periimplantite.^{48,49}

Até o presente momento, este é o primeiro estudo investigando polimorfismos do tipo *tag*SNPs do gene *OPG* e sua associação com a perda de mini-implantes ortodônticos.

Com base nos resultados genéticos obtidos, o alelo T, no modelo dominante para o mesmo alelo, do *tag*SNP rs11573938, associou-se com a perda de mini-implantes ($p=0,049$), ainda que esse resultado seja *borderline*. Contudo, certa cautela é necessária nessa interpretação, uma vez que na amostra, houve um número reduzido de indivíduos com esse alelo, mesmo heterozigotos. Portanto, para confirmar que o rs11573938, é um marcador genético de suscetibilidade à perda de mini-implantes ortodônticos, o número amostral deve ser enriquecido ou deve haver a replicação do estudo em outras populações.

Porém, esse mesmo marcador (rs11573938), localizado no gene *OPG* no 4º íntron, de acordo com o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*),⁵⁰ foi associado ao aumento do conteúdo mineral ósseo do colo do fêmur em crianças negras da África do Sul.⁵¹

Os polimorfismos rs102724 e rs134057 do gene *OPG* estão em alto desequilíbrio de ligação ($r^2>80\%$) na população estudada, o que significa que em futuros estudos, apenas um desses dois SNPs será necessário durante a investigação do gene.

Todavia, o estudo aqui referido apresenta algumas limitações. O reduzido número amostral para estudos genéticos, diminui o *power* estatístico da identificação da associação quando ela realmente existe. Ademais, a frequência dos alelos mais raros foi muito pequena na população estudada, o que tornou os polimorfismos pouco informativos. Neste estudo, escolhemos os *tagSNPs* da população CEU do *International HapMap Project, release 24* (www.hapmap.org), pois os pacientes selecionados para este estudo são da região sul do Brasil, que é considerada uma população com descendência Europeia. Porém, a população brasileira é uma população Caucasiana “não pura”, considerada miscigenada. Além do mais, três dos 12 *tagSNPs* selecionados para a cobertura completa de todo o gene *OPG* (rs11573856, rs7010267, rs11573901) não funcionaram, podendo ter deixado alguma sequência excluída da análise.

Adicionalmente, apesar de todos os outros oito *tagSNPs* (rs3102724, rs11573884, rs2875845, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267 e rs11573901) não terem apresentado qualquer evidência de associação com a perda de MIs, para estudos genéticos de traços complexos, amostras mais robustas devem ser estudadas.

Finalmente, mais estudos são necessários, incluindo os polimorfismos do gene *OPG* que não amplificaram, em amostras mais enriquecidas. Além disso, estudos abrangendo outros genes candidatos relacionados ao metabolismo ósseo, podem ser efetuados.

CONCLUSÕES

O alelo T do rs11573938, no modelo dominante para o alelo T, apresentou-se associado com a perda de MIs na análise univariada. No entanto, na análise multivariada, apenas o número de MIs instalados associou-se ao desfecho.

Os *tag*SNPs rs102724 e rs134057 mostraram-se em alto desequilíbrio de ligação na população estudada, podendo, em uma genotipagem futura, somente um deles ser utilizado.

Os resultados aqui apresentados fortalecem o conceito de interação entre aspectos clínicos e genéticos, que juntos aumentam o risco na modulação da susceptibilidade a doenças complexas.

REFERÊNCIAS

1. Freitas AO, Alviano CS, Alviano DS, Siqueira Jr JF, Nojima LI, Nojima Mda C. Microbial colonization in orthodontic mini-implants. *Braz Dent J* 2012;23:422-427.
2. Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C, Trevilatto PC. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016;45:649-657.
3. Abbassy MA, Bakry AS, Zawawi KH, Hassan AH. Long-term durability of orthodontic mini-implants. *Odontology* 2018;106.2: 208-214.
4. Chang H-P, Tseng Y-C. Miniscrew implant applications in contemporary orthodontics. *Kaohsiung J Med Sci* 2014;30:111-115.
5. Cousley R, Sandler P. Advances in orthodontic anchorage with the use of mini-implant techniques. *Br Dent J* 2015;218:E4.
6. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yu WJ. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:284-291.
7. Nahm K-Y, Heo JS, Lee J-H, Lee D-Y, Chung K-R, Ahn H-W, Kim S-H. Gene profiling of bone around orthodontic mini-implants by RNA-sequencing analysis. *Biomed Res Int* 2015:1-14
8. Xu Y, Xie J. Comparison of the effects of mini-implant and traditional anchorage on patients with maxillary dentoalveolar protrusion. *Angle Orthod* 2016;87:320-327.
9. Di Leonardo B, Ludwig B, Lisson JA, Contardo L, Mura R, Hourfar J. Insertion torque values and success rates for paramedian insertion of orthodontic mini-implants. *J Orofac Orthop* 2018;79:109-115.
10. Consolaro A, Romano FL. Reasons for mini-implants failure: choosing installation site should be valued! *Dental Press J Orthod* 2014;19:18-24.

11. Hourfar J, Bister D, Lux CJ, Al-Tamimi B, Ludwig B. Anatomic landmarks and availability of bone for placement of orthodontic mini-implants for normal and short maxillary body lengths. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017;151:878-886.
12. Assad-Loss TF, Kitahara-Céia FMF, Silveira GS, Elias CN, Mucha JN. Fracture strength of orthodontic mini-implants. *Dental Press J Orthod* 2017;22:47-54.
13. Feldmann I, Bondemark L. Anchorage capacity of osseointegrated and conventional anchorage systems: a randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:339.e319-339.e328.
14. Hourfar J, Bister D, Kanavakis G, Lisson JA, Ludwig B. Influence of interradicular and palatal placement of orthodontic mini-implants on the success (survival) rate. *Head Face Med* 2017;13:2-6.
15. Chen Y, Kang ST, Bae S-M, Kyung H-M. Clinical and histologic analysis of the stability of microimplants with immediate orthodontic loading in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:260-267
16. Pithon MM, Nojima MG, Nojima LI. Primary stability of orthodontic mini-implants inserted into maxilla and mandible of swine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:748-754.
17. Ren H, Ren H, Li X, Yu D, Mu S, Chen Z, Fu Q. Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/M-CSF in the MC3T3-E1 osteoblast cell line. *Mol Med Rep* 2015;12:6711-6717.
18. Lacey D, Timms E, Tan H-L, Kelley M, Dunstan C, Burgess T. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
19. Vorkapic E, Kunath A, Wågsäter D. Effects of osteoprotegerin/TNFRSF11B in two models of abdominal aortic aneurysms. *Mol Med Rep* 2018;18:41-48.

20. Trevilatto PC, Werneck RI. Genética Odontológica: Série Abeno. Artes Médicas Editora; 2014.
21. Pacifico L, Andreoli GM, D'Avanzo M, De Mitri D, Pierimarchi P. Role of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand axis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2018;24:2073-2082.
22. Pivonka P, Zimak J, Smith DW, Gardiner BS, Dunstan CR, Sims NA, Martin TJ, Mundy GR. Theoretical investigation of the role of the RANK–RANKL–OPG system in bone remodeling. *J Theor Biol* 2010;262:306-316.
23. Mulcahy LE, Taylor D, Lee TC, Duffy GP. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells. *Bone* 2011;48:182-188.
24. Li Y, Guo Y, Wang Q, Ouyang Y, Cao Y, Jin T, Wang J. Osteoprotegerin polymorphisms are associated with alcohol-induced osteonecrosis of femoral head in Chinese Han population from Henan province. *J Genetic* 2016;95:983-989.
25. Montañez-Barragán A, Gómez-Barrera I, Sanchez-Niño MD, Uceró AC, González-Espinoza L, Ortiz A. Osteoprotegerin and kidney disease. *J Nephrol* 2014;27:607-617.
26. Galeone A, Paparella D, Colucci S, Grano M, Brunetti G. The role of TNF- α and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease. *ScientificWorldJournal* 2013:1-10.
27. Jia P, Wu N, Jia D, Sun Y. Association between Osteoprotegerin gene polymorphisms and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Balkan J Med Genet* 2017;20:27-33.
28. Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998;254:685-691.

29. Özkalaycı F, Gülmez Ö, Uğur-Altun B, Pandi-Perumal SR, Altun A. The Role of Osteoprotegerin as a Cardioprotective Versus Reactive Inflammatory Marker: the Chicken or the Egg Paradox. *Balkan Med J* 2018;35:225.
30. Roskamp L, Trevilatto P, Souza C, Silva Neto U, Carneiro E, Fariniuk L, Westphalen VPD. Analysis of the association of clinical factors and il4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J* 2018;51.1:12-19.
31. Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res Appl* 2014;10:264-296.
32. Sun X, Zhang J. Identification of putative pathogenic SNPs implied in schizophrenia-associated miRNAs. *BMC Bioinformatics* 2014;15:2-9.
33. Köberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Arch Toxicol* 2016;90:2369-2388.
34. Doetzer AD, Schlipf N, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Werneck R, Riess O et al. Lactotransferrin Gene (LTF) Polymorphisms and Dental Implant Loss: A Case-Control Association Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17:e550-e561.
35. Trevilatto P, Line S. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:6-9.
36. Aidar M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18:148-152.
37. Hourfar J, Kanavakis G, Goellner P, Ludwig B. Fully customized placement of orthodontic miniplates: a novel clinical technique. *Head Face Med* 2014;10:2-7.
38. Papadopoulos M, Papageorgiou S, Zogakis I. Clinical effectiveness of orthodontic miniscrew implants: a meta-analysis. *J Dent Res* 2011;90:969-976.

39. Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Predisposing factors for orthodontic mini-implant failure defined by bone strains in patient-specific finite element models. *Ann Biomed Eng* 2016;44:2948-2956.
40. Motoyoshi M, Yoshida T, Ono A, Shimizu N. Effect of cortical bone thickness and implant placement torque on stability of orthodontic mini-implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22.5:779-784.
41. Romano FL, Consolaro A. Why are mini-implants lost: The value of the implantation technique! *Dental Press J Orthod* 2015;20:23-29.
42. Park HS. Clinical study on success rate of microscrew implants for orthodontic anchorage. *Korean J Orthod* 2003;33:151-156.
43. Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:373-378.
44. Baek S-H, Kim B-M, Kyung S-H, Lim JK, Kim YH. Success rate and risk factors associated with mini-implants reinstalled in the maxilla. *Angle Orthod* 2008;78:895-901.
45. Babür C, Özcan G, Çebi DU, Pervane B, Özdemir B, Yücel A et al. Gingival crevicular fluid levels of osteoprotegerin (OPG) in premenopausal and postmenopausal women with or without chronic periodontitis. *J Dent* 2012;40:364-371.
46. Ney JT, Juhasz-Boess I, Gruenhage F, Graeber S, Bohle RM, Pfreundschuh M, Solomayer EF, Assmann G. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer. *BMC Cancer* 2013;13:2-10.
47. Park OJ, Shin SY, Choi Y, Kim MH, Chung CP, Ku Y, Kim KK. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. *Oral Dis* 2008;14:440-444.

48. Kadkhodazadeh M, Alizadeh Tabari Z, Ardakani MRT, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* 2012;5.4:381-388.
49. Zhou J, Zhao Y. Osteoprotegerin gene (OPG) polymorphisms associated with peri-implantitis susceptibility in a Chinese Han population. *Med Sci Monit* 2016;22:4271-4276.
50. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012202.1?&feature=any Acesso em: 21 de setembro de 2018
51. May A, Pettifor JM, Norris SA, Ramsay M, Lombard Z. Genetic factors influencing bone mineral content in a black South African population. *J Bone Miner Metab* 2013;31:708-716.

ARTIGO EM INGLÊS

Title page

STUDY OF POLYMORPHISMS ASSOCIATION IN THE *OPG* GENE WITH LOSS OF ORTHODONTIC MINI-IMPLANTS

Lais Cristina Giacobbo

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

School of Life Sciences

Graduate Program in Dentistry

Email: laisgiacobbo@hotmail.com

Corresponding author: Paula Cristina Trevilatto. School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho. Curitiba, PR, Brazil. CEP: 80215-901. Tel: +55 (41) 3271-1637, email: paula.trevilatto@pucpr.br

ABSTRACT

Objective: To investigate the association of *tag*SNPs genetic polymorphisms of the Osteoprotegerin gene (*OPG*) with the loss of orthodontic mini-implants. **Materials and methods:** The sample consisted of 135 patients of both sexes, with average age of 48.7 ± 10 (20 to 76 years). The control group consisted of 104 patients, with no mini-implants lost for at least 6 months and the case group for 31 patients with at least 1 missing mini-implant. Cells were obtained by mouthwash with 3% glucose solution for 1 minute and scraping the buccal mucosa with sterilized spatula. The DNA was extracted from buccal epithelial cells and 10 M ammonium acetate and 1 mM EDTA, and the analysis of polymorphisms of the *OPG* gene, performed by Real Time PCR technique. Univariate and multivariate analyzes were performed ($p < 0,05$). **Results:** Considering the *OPG* gene polymorphisms, the T allele of rs11573938 (dominant model for the T allele; CC vs CT + TT), was shown to be associated with the loss of mini-implants ($p = 0,049$). After the multivariate analysis, the variable that remained associated was the number of mini-implants installed. **Conclusion:** Only the number of installed mini-implants was associated with the loss of orthodontic mini-implants after multivariate analysis. The results presented here strengthen the concept of interaction between clinical and genetic aspects, which together increase the risk of modulating susceptibility to complex diseases.

<i>Key words:</i> genetic polymorphisms, <i>OPG</i> , mini-implant, loss of mini-implants

INTRODUCTION

Orthodontic Anchorage

Orthodontic anchoring can be defined as resistance to unwanted dental movements.^{1,2} Thus, having good anchorage control is essential for successful orthodontic treatment.^{2,3} However, ensuring adequate anchoring is often a challenge in Orthodontics Dentofacial Orthopedics.⁴

Throughout the 20th century, the extraoral appliance was pointed to as the "gold standard" for reinforcement of anchorage, however, it is often associated with problems of cooperation on the part of patients. Thus, anchorage loss occurs.⁵ Consequently, the increasing search for minimal collaboration and at the same time maximum corrective effects have made the Temporary Anchoring Devices (TADs) an excellent alternative to traditional orthodontic anchoring,⁶ as they have made mechanics simpler and more efficient than conventional techniques.⁷

In recent years, mini-implants (MIs) have gained enormous popularity in the orthodontic environment⁸ and have become a reliable method of providing temporary orthodontic anchorage.⁹ Its use allows the movement to be performed without side effects on the other teeth,¹⁰ in addition to being a mechanism generally well accepted by patients,^{11,12} due to its simplicity in installation and removal, low cost, and possibility of immediate usage after installation,¹³ being able to be used in several places due to its small size, besides being a procedure minimally traumatic.

The success rate of MIs is reported to be approximately 84%.¹⁴ Its success depends on factors such as type, diameter and length of the mini-implant (MI),¹ orthodontic mechanics, dentist's ability,^{1,10} bone thickness of the host,¹ oral hygiene,^{1,10} presence of inflammation of the soft tissues surrounding the MI^{2,10} and genetic factors.² In addition, some degree of osseointegration¹⁵ may also be necessary and primary healing in around the MI-bone surface should occur.⁶ This primary stability involves direct contact between the mini-implant and bone and is an important signal for a successful insertion, since cases of failure occur during the initial stages after such a procedure.¹⁶

RANK/RANKL/OPG System

Bone is a dynamic tissue that constantly undergoes a process of renewal and repair, called bone remodeling. This is an essential physiological process in bone tissue in healthy humans,¹⁷ which involves bone resorption by osteoclasts and bone matrix synthesis by osteoblasts.¹⁸

The RANK (kappa nuclear factor receptor activator receptor), RANKL (kappa beta nuclear factor receptor activator receptor) and OPG (osteoprotegerin), is involved in bone remodeling and regulates the differentiation and activation of osteoclasts. Therefore, there is a crucial balance between bone formation and bone resorption.¹⁹ In view of this, this system has been described as a central regulator of bone metabolism.²⁰

RANKL was shown to bind to its RANK receptor in cells of the osteoclast family to induce osteoclastogenesis. The RANKL molecule, blocked by the soluble receptor OPG, was identified as a key mediator of osteoclastogenesis, both attached to the membrane of pre-osteoblastic cells and stromal cells, and in the soluble form.²⁰ Thus, OPG acts as a decoy receptor, regulating this interaction and competition with RANK, preventing RANK-RANKL interactions.²¹ Thus, the catabolic effects of RANKL are minimized by OPG, which binds to RANKL, avoiding the activation of the RANK²² receptor and, consequently, reducing bone resorption.²³

First recognized in 1977,²¹ OPG was the first molecule identified in the RANK/RANKL/OPG axis.²⁴ It is a cytokine, belonging to the tumor necrosis factor receptor 11B family (TNFRSF11B)^{19,21,23} and was named OPG, due to its more well-characterized effect: bone protection.^{21,25}

OPG is expressed in multiple organs and cells including heart, lung, stomach, liver, kidney, spleen, intestine, skin, thymus, lymph nodes, bone marrow, osteoblasts, vascular smooth muscle cells, dendritic cells, B lymphocytes, articular chondrocytes, thyroid gland, spinal cord and brain.²⁵

The *OPG* gene

The OPG is encoded by a gene (*OPG*), which is located on the long arm of chromosome 8, at position 24 (8q24)^{26,27} and is made up of five exons,^{21,28} and

covers 29 kb of the human genome.²⁸ In its biochemical aspect, it is a soluble glycoprotein, synthesized from 401 aminoacids,^{21,29} with a molecular mass of 60 kDa.²¹

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common forms of DNA variation,³⁰ which can be found in either the coding or non-coding regions of the gene, or between the genes.³¹ They represent the substitution of a single nucleotide, adenine (A), substituted by one of the other three nitrogenous bases: thymine (T), cytosine (C) or guanine (G),³² generating common alleles in the population.³³

SNPs are markers of choice in genetic analysis,³¹ because they can confer susceptibility or protective modulation against complex diseases³⁴ and can affect the amount or function of expressed proteins.³⁰ Thus, investigating SNPs in the human genome can provide advances in novel therapeutic targets.³¹

It is extremely important to determine the direct and indirect systemic factors that cause the host response to identify risk groups for the development of undesirable pathological responses. Thus, the search for genetic markers that make it possible to identify individuals more prone to the loss of MIs is fundamental to prevent the installation of the destructive process.

It is extremely important to determine the direct and indirect systemic factors that cause the host response to identify risk groups for the development of undesirable pathological responses. Thus, the search for genetic markers that make it possible to identify individuals more prone to the loss of MIs is fundamental to prevent the installation of the destructive process.

In recent years, many clinical factors related to the success of MIs have been studied extensively. However, to date, there is only one study investigating the association of MI loss with genetic factors, in which the candidate gene investigated was the *IL-6* gene.²

The objective of this study was to investigate the association of polymorphisms in the *OPG* gene with the susceptibility to loss of mini-implants for orthodontic anchoring in a sample of patients from the city of Curitiba-PR / Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

This cross-sectional study is based on case-control populations. A total of 487 records were analyzed from the Latin American Institute for Research and Dental Education (ILAPEO), located in Curitiba, Paraná, from 2004 to 2010. From of these, 148 patients were included in the study because they were treated with orthodontic mini-implants (NEODENT® Osseointegrable Implant). Eight patients were excluded because of syphilis, pregnancy or lactation, and five refused to participate. Thus, the study was developed with a group of 135 patients of both sexes, with ages ranging from 20 to 76 years (average age of 48.7 ± 10). The control group was composed of 104 patients with no MI that was lost for at least 6 months, and the case group consisted of 31 patients who had at least 1 MI lost.

All patients signed a free and informed consent form. The number of MIs installed and lost was verified in the clinical file of the patients. The project was approved by the Research Ethics Committee of PUCPR, protocol 5693/10.

DNA Collection and Purification

Cells were obtained by means of a mouthwash with 3% glucose solution for 1 minute and scraping of the jugal mucosa with a sterilized wooden spatula.³⁵ After this, the tip of the spatula was agitated inside the mouthwash solution. Oral epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 1300 μ l extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. 10 μ l of proteinase K (20 mg / ml) was added to the solution, left overnight at 65°C. The DNA was purified by the addition of 10 M ammonium acetate, precipitated with isopropanol and resuspended with 50 μ l of extraction solution [10 mM Tris (pH 7.6) and 1 mM EDTA].³⁶

Analysis of OPG gene *tag*SNPs

Near SNPs are often correlated in terms of linkage disequilibrium (DL). When these SNPs are in strong DL, they can capture information from other SNPs of the same block (or bin) and are called *tag*SNPs. The strategy of genotyping *tag*SNPs

is to find information about an entire gene, reducing costs and time. Genotyping *tag*SNPs excludes the need to genotype all SNPs of a given gene. Thus, *tag*SNPs from the *OPG* gene were selected according to information available in the International HapMap Project, release 24 (www.hapmap.org).

All 12 markers selected had a minimum allele frequency (FAM) of 0.05 in the CEU population (descendants of Northern and Western Europe). The cut-off parameter to define the DL between two markers was a multi-marker logarithm of $r^2 > 0.8$, considered a high DL level. Following these criteria, the following *tag*SNPs were selected:

OPG: rs11573938, rs3102724, rs11573884, rs2875845, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267, rs11573901.

Patients were genotyped for *tag*SNPs by the Real Time PCR (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using TaqMan™ Genotyping Max Mister (Applied Biosystems). The negative control was used in all the genotypes performed.

Three *tag*SNPs polymorphisms were not amplified, possibly by inappropriate primer design, with rs11573856, rs7010267 and rs11573901 being disregarded from the analysis.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed in the SPSS program, version 20.0, and the Hardy-Weinberg equilibrium and the link disequilibrium map between the SNPs obtained in Haploview 4.1.

Nominal variables were expressed as frequency and percentage. Pearson's chi-square test and Fisher's exact test were used to test differences between groups for categorical variables. The following genetic models were analyzed: dominant and recessive, evaluated by Pearson's chi-square test or Fisher's exact test. The additive model, evaluated by binary logistic regression.

For the multivariate analysis, the binary logistic regression model was used, including independent variables that obtained values of $p < 0.20$ in the univariate analysis. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Risk estimates were assessed by calculating Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI).

RESULTS

Clinical and Sociodemographic Parameters

The success rate of orthodontic mini-implants was 87.5%.

The results concerning the clinical and sociodemographic variables of the sample of the present study were published by Reichow et al.,² and are summarized in Tables I and II.

Table I. Results of the univariate analysis, considering the clinical and sociodemographic variables for the control and case groups (n=135).

Patient Data	Control Group n=104 %		Case Group n=31 %		p-value	OR (95% CI)
Sex						
Male	29	27.9	7	22.6	0.648*	1.33 (0.52 - 3.41)
Female	75	72.1	24	77.4		
Age	48.69 ± 10.31		48.77 ± 9.11		0.968 ^t	
Smoking Habit	26	25.0	12	38.7	0.172*	1.89 (0.81 - 4.42)
Hygiene Habits						
Brushing daily over 3 times	90	86.5	24	77.4	0.260*	0.53 (0.19 - 1.47)
Dental floss use	97	93.3	28	90.3	0.696*	0.67 (0.16 - 2.78)
Mouthwash	98	94.2	30	96.8	1.000*	1.84 (0.21 - 15.87)
DMTF						
Up to 10	8	7.7	2	6.5	1.000*	1.21 (0.24 - 6.01)
More than 10	96	92.3	29	93.5		
CPITN						
0	66	63.5	17	54.8	0.407*	1.43 (0.63 - 3.22)
1, 2 and 3	38	36.5	14	45.2		
Number of mini-implants installed per patient						
1	27	26.0	0	0.0	0.001*	
>1	77	74.0	31	100.0		

*Fischer exact test

^tStudent *t*-test

DMFT, Decayed/Missing/Filled Teeth index

CPITN, Community Periodontal Index of Treatment Needs

Source: Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. Int J Oral Maxillofac Surg 2016;45:649-657.

Table II. Results of the univariate analysis, considering the variables of the orthodontic mini-implants (n = 311).

Local MI data	Control Group n=272 %		Case Group n=39 %		p - value	OR (95% CI)
Jaw of installation	269	98.90	39	100.00		
Maxilla	151	91.52	14	8.48	0.025**	2.29 (1.14 - 4.49)
Mandible	118	82.52	25	17.48		
Position of intallation	269	98.90	39	100.00		
Vestibular	196	87.11	29	12.89	0.890*	
Lingual	42	89.36	5	10.64		
Alveolar ridge	31	86.11	5	14.89		
Diâmeter (mm)[§]	272	100.00	39	100.00		
1.3	36	85.71	6	14.29	0.802**	
1.6/2.0	236	87.73	33	12.27		
Lenght (mm)[£]	272	100.00	39	100.00		
5	9	90.00	1	10.0	0.948*	
7	145	86.83	22	13.17		
9	82	87.23	12	12.77		
11	36	90.00	4	10.00		
Type of neck^{&}	272	100.00	39	100.00		
CB (low neck)	116	89.92	13	10.08	0.542*	
CM (middle neck)	125	85.62	21	14.38		
CA (hight neck)	31	86.11	5	13.89		
Type of de anchorage	220	80.88	31	79.49		
Direct	177	88.50	23	11.50	0.474**	
Indirect	43	84.31	8	15.69		
Type of moviment	233	85.66	35	89.74		
Intrusion	123	90.44	13	9.56	0.109*	
Uprighting	54	79.41	14	20.59		
Foward	17	80.95	4	19.05		
Backward	39	90.70	4	9.30		

Pearson chi-square test

**Fischer exact test

[§]A diameter of 1.6mm was used in 85% of cases, 1.3mm in 13.50% and 2.0mm in 0.64%

[£]A lenght of 5mm was used in 2.89% of cases, 7mm em 53.70%, 9mm in 30.23% and 11mm in 11.57%

Source: Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. Int J Oral Maxillofac Surg 2016;45:649-657.

Analysis of Polymorphisms in Gene *OPG*

The genotype distribution of the *OPG* gene was presented in Hardy-Weinberg equilibrium in the control group. The tagSNPs rs102724 and rs3134057 are in high DL ($r^2=89\%$). The complete physical mapping of DL of the *OPG* gene for the study population can be verified in figure 1.

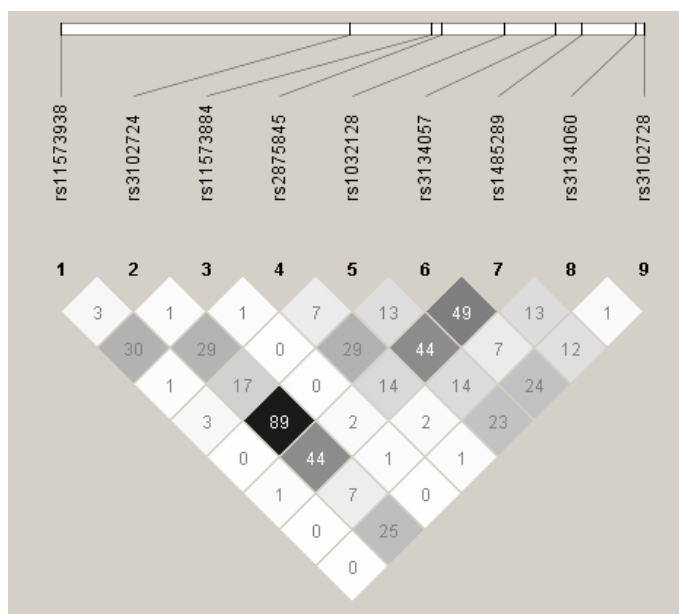


Figure 1. Map of linkage disequilibrium (DL) of the selected tagSNPs of the *OPG* gene in the study population. The number within the squares indicates the ratio in% of DL. The intensity of the color inside the squares reflects the degree of DL between two loci: the darker intensity represents a higher DL degree among the SNPs.

The T allele of rs11573938 (dominant model for the T allele, CC vs CT + TT), was associated with loss of orthodontic mini-implants ($p=0.049$), (Table III). The remainder of the tagSNPs (rs3102724, rs2875845, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267, rs11573901) had no association with loss of MIs either in the sense of susceptibility (predisposition) or in the sense of protection in none of the genetic models studied (Tables III and IV).

Table III. Results of the univariate analysis of the *OPG* gene *tag*SNPs for the dominant and recessive models for the control and case (n=135) groups.

<i>TagSNPS</i> dbSNP ID ^a	Alleles 1/2 ^{&}	Groups	Genotypes	Genotypes	<i>p</i> -value	OR (95% CI)
rs1032128 - Dom G n=133	[G/A]	Control n (%)	GG + AG 90 (87.4)	AA 13 (12.6)	0.190**	0.239 (0.030 - 1.904)
		Case n (%)	29 (96.7)	1 (3.3)		
rs1032128 - Rec G n=133	[G/A]	Control n (%)	AG + AA 51 (49.5)	GG 52 (50.5)	0.214*	1.694 (0.734 - 3.912)
		Case n (%)	11 (36.7)	19 (63.3)		
rs1485289 - Dom G n=126	[G/A]	Control n (%)	GG + AG 67 (69.8)	AA 29 (30.2)	0.145*	0.462 (0.161 - 1.326)
		Case n (%)	25 (83.3)	5 (16.7)		
rs1485289 - Rec G n=126	[G/A]	Control n (%)	AG + AA 70 (72.9)	GG 26 (27.1)	0.756*	1.154 (0.468 - 2.842)
		Case n (%)	21 (70.0)	9 (30.0)		
rs 2875845 - Dom A n=134	[A/G]	Control n (%)	AA + AG 102 (98.1)	GG 2 (1.9)	0.536**	1.759 (0.154 - 20.089)
		Case n (%)	29 (96.7)	1 (3.3)		
rs 2875845 - Rec A n=134	[A/G]	Control n (%)	AG + GG 26 (25.0)	AA 78 (75.0)	0.571*	1.333 (0.491 - 3.619)
		Case n (%)	6 (20.0)	24 (80.0)		
rs 3102728 - Dom T n=135	[T/C]	Control n (%)	TT + CT 94 (98.9)	CC 1 (1.1)	1.000**	-
		Case n (%)	24 (100.0)	0 (0.0)		
rs 3102728 - Rec T n=135	[T/C]	Control n (%)	CT + CC 19 (20.0)	TT 76 (80.0)	0.560**	1.750 (0.472 - 6.486)
		Case n (%)	3 (12.5)	21 (87.5)		
rs 3134057 - Dom A n=134	[A/G]	Control n (%)	AA + AG 91 (88.3)	GG 12 (11.7)	1.000**	0.813 (0.214 - 3.85)
		Case n (%)	28 (90.3)	3 (9.7)		
rs 3134057 - Rec A n=134	[A/G]	Control n (%)	AG + GG 57 (55.3)	AA 46 (44.7)	0.961*	1.020 (0.455 - 2.287)
		Case n (%)	17 (54.8)	14 (45.2)		
rs 3134060 - Dom A n=131	[A/G]	Control n (%)	AA + AG 100 (99.0)	GG 1 (1.0)	1.000**	-
		Case n (%)	30 (100.0)	0 (0.0)		
rs 3134060 - Rec A n=131	[A/G]	Control n (%)	AG + GG 25 (24.8)	AA 76 (75.2)	0.591*	1.316 (0.483 - 3.585)
		Case n (%)	6 (20.0)	24 (80.0)		

rs 11573884 - Dom G n=128	[G/C]	Control n (%)	GG + CG 94 (94.9)	CC 5 (5.1)	1.000**	0.671 (0.075 - 5.988)
		Case n (%)	28 (96.6)	1 (3.4)		
rs 11573884 - Rec G n=128	[G/C]	Control n (%)	CG + CC 12 (12.1)	GG 87 (87.9)	0.475*	0.662 (0.212 - 2.064)
		Case n (%)	5 (17.2)	24 (82.8)		
rs 11573938 - Dom C n=135	[C/T]	Control n (%)	CC + CT 103 (99.0)	TT 1 (1.0)	1.000**	-
		Case n (%)	31 (100.0)	0 (0.0)		
rs 11573938 - Rec C n=135	[C/T]	Control n (%)	CT + TT 12 (11.5)	CC 92 (88.5)	0.049*	0.375 (0.137 - 1.000)
		Case n (%)	8 (25.8)	23 (74.2)		
rs 3102724 - Dom G n=134	[G/A]	Control n (%)	GG + AG 93 (89.4)	AA 11 (10.6)	1.000**	0.939 (0.244 - 3.611)
		Case n (%)	27 (90.0)	3 (10.0)		
rs 3102724 - Rec G n=134	[G/A]	Control n (%)	AG + AA 55 (52.9)	GG 49 (47.1)	0.781*	1.122 (0.498 - 2.530)
		Case n (%)	15 (50.0)	15 (50.0)		

^aSNP identifier based on the NCBI dbSNP

[&]The allele1 is more frequent in the study group

*Pearson chi-square test

**Fisher exact test

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

Table IV. Result of the univariate analysis of the *OPG* gene *tag*SNPs for the additive model for the control and case groups (n=135).

<i>Tag</i> SNPs dbSNP ID ^a	Alleles ^{&}	Genotypes	Control Group n (%)	Case Group n (%)	<i>p</i> -value*	OR (95% CI)
rs1032128 n=133	[G/A]	GG	52 (50.5)	19 (63.3)	0.303	
		AG	38 (36.9)	10 (33.3)	0.146	4.750 (0.581 - 38.817)
		AA	13 (12.6)	1 (3.3)	0.262	3.421 (0.399 - 29.367)
rs1485289 n=126	[G/A]	GG	26 (27.1)	9 (30.0)	0.346	
		AG	41 (42.7)	16 (53.3)	0.261	2.008 (0.596 - 6.764)
		AA	29 (30.2)	5 (16.7)	0.150	2.263 (0.745 - 6.876)
rs2875845 n=134	[A/G]	AA	78 (75.0)	24 (80.0)	0.700	
		AG	24 (23.1)	5 (16.5)	0.697	0.615 (0.053 - 7.086)
		GG	2 (1.9)	1 (3.3)	0.507	0.417 (0.031 - 5.535)
rs3102728 n=135	[T/C]	TT	76 (80.0)	21 (87.5)	0.753	
		CT	18 (18.9)	3 (12.5)	1	-
		CC	1 (1.1)	0 (0.0)	1	
rs3134057 n=134	[A/G]	AA	46 (44.7)	14 (45.2)	0.953	
		AG	45 (43.7)	14 (45.2)	0.783	1.217 (0.300 - 4.934)
		GG	12 (11.7)	3 (9.7)	0.76	1.244 (0.307 - 5.047)
rs3134060 n=131	[A/G]	AA	76 (75.2)	24 (80.0)	0.902	
		AG	24 (23.8)	6 (20.0)	1	-
		GG	1 (1.0)	0 (0.0)	1	
rs11573884 n=128	[G/C]	GG	87 (87.9)	24 (82.8)	0.516	
		CG	7 (7.1)	4 (13.8)	0.774	1.379 (0.154 - 12.375)
		CC	51 (3.9)	1 (3.4)	0.406	2.857 (0.241 - 33.902)
rs11573938 n=135	[C/T]	CC	92 (88.5)	23 (74.2)	0.121	
		CT	11 (10.6)	8 (25.8)	1	-
		TT	1 (1.0)	0 (0.0)	1	
rs3102724 n=134	[G/A]	GG	49 (47.1)	15 (50.0)	0.962	
		AG	44 (42.3)	12 (40.0)	0.872	1.122 (0.276 - 4.559)
		AA	11 (10.6)	3 (10.0)	1	1.000 (0.240 - 4.167)

^aSNP Identifier based on the NCBI dbSNP

[&]The allele 1 is more frequent in the study group

*Binary logistic regression

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

Multivariate analysis

Multivariate analysis is a tool used to study the behavior of multiple variables simultaneously. In the specific case, we considered the variables that obtained a value of $p < 0.20$ in the univariate analysis, which were: number of mini-implants installed per patient ($p = 0.001$) and smoking habits ($p = 0.172$) (Table 1).

In the *OPG* gene, the rs1032128 in the dominant model for the G allele: $p = 0.190$ and in the additive model: $p = 0.146$; the rs1485289 in the dominant model for the G allele: $p = 0.145$ and in the additive model: $p = 0.15$, and the rs11573938 in the dominant T model for the T allele: $p = 0.049$ and in the additive model: $p = 0.121$.

The number of mini-implants installed per patient (Result published by Reichow et al.,²) was the only variable that remained associated with loss of orthodontic mini-implants after multivariate analysis ($p = 0.000$), showing an increase of the risk by more than 14 times, in the presence of the alleles mentioned above (Table V).

Table V. Results of the multivariate analysis for the control and case groups.

General Data	Control Group n= 104 %		Case Group n=31 %		p-value*	OR (95% CI)
Number of MIs installed per patient						
1 or 2	84	80.8	7	22.6	0.000	14.400 (5.443 - 38.099)
3, 4 or 5	20	19.2	24	77.4		

*Binary logistic regression

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

DISCUSSION

Mini-implants have become very popular among orthodontists, mainly because they are very effective devices in orthodontic treatments with high demand for anchorage.³⁶ The success rate of the mini-implants of the sample studied (published in the study by Reichow et al.²) was 87.5%, very similar to other articles found in the literature, which reported the success rate as being greater than 80%.^{14,38,39}

However, mini-implants sometimes fail. Albogha et al.,³⁹ reported the loss rate of MIs as being between 13.4% and 20.1%.

In view of this, it has been reported that the risk of failure is greater in younger patients younger than 20 years of age compared to older patients (>20 years).⁴ This is possibly due to active and low bone metabolism maturation of maxillomandibular complex bones in growing children.⁴⁰ Consequently, this could explain the high rate of success achieved in the study by Reichow et al.,² in which patients were aged between 20 and 76 years.

Moreover, the number of mini-implants installed has been shown to be associated with the loss of MIs.² This can be explained, due to anatomical conditions that could influence the installation angle and the incidence of mechanical forces, or the increase of inflammation, along with surgical trauma, which could reduce the permanence of MIs.² Mechanical factors, such as the size and design of MIs, may also interfere with their stability. Thus, Romano et al.,⁴¹ reported that in the presence of important anatomical structures, the ideal mini-implant size for each site should be used, always considering an additional margin of safety. Therefore, longer devices, from 8 to 9 mm are recommended for the posterior region, while the shorter devices, from 6 to 7 mm, for the upper and lower anterior region.

Another factor associated with the loss of MIs was the place of installation, where the highest prevalence of losses occurred in the mandible when compared to the maxilla.² The bone density of the mandible is high and this requires higher insertion torque, causing overheating and consequently bone damage, which decreases the survival rate of the mini-implants.⁶ These results corroborate with

several other studies that support the hypothesis that the success rate of mini-implants inserted into the maxilla is in fact higher than than in the mandible.^{40,42,43}

However, if MI falls for some reason, there are two options: reinstall a new one in the same area after 4 to 6 weeks or install a new one in an adjacent area immediately.⁴⁴ The fact is that many authors seek to explain this failure³⁹ of multifactorial origin.^{2,4}

OPG is an essential cytokine for osteoclastogenesis, as it is very effective in the process of bone remodeling.⁴⁵ Studies have associated polymorphisms in the OPG gene with bone mineral density, bone turnover, osteonecrosis induced by bisphosphonates in the mandible, ankylosing spondylitis, osteoporosis, arthroplasty of Charcot, breast cancer,⁴⁶ periodontitis⁴⁷ and peri-implantitis.^{48,49}

To date, this is the first study investigating *tag*SNPs polymorphisms of the *OPG* gene and its association with the loss of orthodontic mini-implants.

Based on the genetic results obtained, the T allele in the dominant model for the same allele of *tag*SNP rs11573938 was associated with the loss of mini-implants ($p=0.049$), although this result was borderline. However, some caution is required in this interpretation, since in the sample, there were a few individuals with this allele, even heterozygotes. Therefore, to confirm that rs11573938 is a genetic marker of susceptibility to loss of orthodontic mini-implants, the sample number should be enriched or replicate of the study in other populations.

However, this same marker (rs11573938), located in the *OPG* gene at the 4th intron, according to NCBI (National Center for Biotechnology Information),⁵⁰ was associated with increased bone mineral content of the femoral neck in black children from South Africa.⁵¹

The polymorphisms rs102724 and rs134057 of the *OPG* gene are in high binding imbalance ($r^2 > 80\%$) in the population studied, which means that in future studies, only one of these two SNPs will be required during gene research.

However, the study presented here has some limitations. The reduced sample number for genetic studies decreases the statistical power of identifying the association when it actually exists. In addition, the frequency of the rarer alleles was very small in the study population, which made the polymorphisms less informative. In this study, we chose *tag*SNPS from the CEU population of the International

HapMap Project, release 24 (www.hapmap.org), since the patients selected for this study are from southern Brazil, which is considered a population with European descent. However, the Brazilian population is a "non-pure" Caucasian population, considered to be mixed. In addition, three of the 12 *tag*SNPs selected for complete coverage of the entire *OPG* gene (rs11573856, rs7010267, rs11573901) did not work, and may have left some sequence excluded from the analysis.

In addition, although all eight other *tag*SNPs (rs3102724, rs11573884, rs1032128, rs3134057, rs1485289, rs3134060, rs3102728, rs11573856, rs7010267 and rs11573901) have not shown any evidence of association with loss of MIs for genetic trait studies more robust samples should be studied.

Finally, more studies are needed, including non-amplified *OPG* gene polymorphisms in more enriched samples. In addition, studies covering other candidate genes related to bone metabolism may be performed.

CONCLUSIONS

The T allele of rs11573938, in the dominant model for the T allele, was associated with the loss of MIs in the univariate analysis. However, in the multivariate analysis, only the number of MIs installed was associated with the outcome.

The *tag*SNPs rs102724 and rs134057 were shown to be highly unbalanced in the studied population and only one of them could be used in future genotyping.

The results presented here strengthen the concept of interaction between clinical and genetic aspects, which together increase the risk of modulating susceptibility to complex diseases.

REFERENCES

1. Freitas AO, Alviano CS, Alviano DS, Siqueira Jr JF, Nojima LI, Nojima Mda C. Microbial colonization in orthodontic mini-implants. *Braz Dent J* 2012;23:422-427.
2. Reichow A, Melo A, de Souza C, Castilhos B, Olandoski M, Alvim-Pereira C, Trevilatto PC. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016;45:649-657.
3. Abbassy MA, Bakry AS, Zawawi KH, Hassan AH. Long-term durability of orthodontic mini-implants. *Odontology* 2018;106.2: 208-214.
4. Chang H-P, Tseng Y-C. Miniscrew implant applications in contemporary orthodontics. *Kaohsiung J Med Sci* 2014;30:111-115.
5. Cousley R, Sandler P. Advances in orthodontic anchorage with the use of mini-implant techniques. *Br Dent J* 2015;218:E4.
6. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yu WJ. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:284-291.
7. Nahm K-Y, Heo JS, Lee J-H, Lee D-Y, Chung K-R, Ahn H-W, Kim S-H. Gene profiling of bone around orthodontic mini-implants by RNA-sequencing analysis. *Biomed Res Int* 2015:1-14
8. Xu Y, Xie J. Comparison of the effects of mini-implant and traditional anchorage on patients with maxillary dentoalveolar protrusion. *Angle Orthod* 2016;87:320-327.
9. Di Leonardo B, Ludwig B, Lisson JA, Contardo L, Mura R, Hourfar J. Insertion torque values and success rates for paramedian insertion of orthodontic mini-implants. *J Orofac Orthop* 2018;79:109-115.
10. Consolaro A, Romano FL. Reasons for mini-implants failure: choosing installation site should be valued! *Dental Press J Orthod* 2014;19:18-24.

11. Hourfar J, Bister D, Lux CJ, Al-Tamimi B, Ludwig B. Anatomic landmarks and availability of bone for placement of orthodontic mini-implants for normal and short maxillary body lengths. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2017;151:878-886.
12. Assad-Loss TF, Kitahara-Céia FMF, Silveira GS, Elias CN, Mucha JN. Fracture strength of orthodontic mini-implants. *Dental Press J Orthod* 2017;22:47-54.
13. Feldmann I, Bondemark L. Anchorage capacity of osseointegrated and conventional anchorage systems: a randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:339.e319-339.e328.
14. Hourfar J, Bister D, Kanavakis G, Lisson JA, Ludwig B. Influence of interradicular and palatal placement of orthodontic mini-implants on the success (survival) rate. *Head Face Med* 2017;13:2-6.
15. Chen Y, Kang ST, Bae S-M, Kyung H-M. Clinical and histologic analysis of the stability of microimplants with immediate orthodontic loading in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:260-267
16. Pithon MM, Nojima MG, Nojima LI. Primary stability of orthodontic mini-implants inserted into maxilla and mandible of swine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;113:748-754.
17. Ren H, Ren H, Li X, Yu D, Mu S, Chen Z, Fu Q. Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/M-CSF in the MC3T3-E1 osteoblast cell line. *Mol Med Rep* 2015;12:6711-6717.
18. Lacey D, Timms E, Tan H-L, Kelley M, Dunstan C, Burgess T. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.
19. Vorkapic E, Kunath A, Wågsäter D. Effects of osteoprotegerin/TNFRSF11B in two models of abdominal aortic aneurysms. *Mol Med Rep* 2018;18:41-48.

20. Trevilatto PC, Werneck RI. Genética Odontológica: Série Abeno. Artes Médicas Editora; 2014.
21. Pacifico L, Andreoli GM, D'Avanzo M, De Mitri D, Pierimarchi P. Role of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand axis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2018;24:2073-2082.
22. Pivonka P, Zimak J, Smith DW, Gardiner BS, Dunstan CR, Sims NA, Martin TJ, Mundy GR. Theoretical investigation of the role of the RANK–RANKL–OPG system in bone remodeling. *J Theor Biol* 2010;262:306-316.
23. Mulcahy LE, Taylor D, Lee TC, Duffy GP. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells. *Bone* 2011;48:182-188.
24. Li Y, Guo Y, Wang Q, Ouyang Y, Cao Y, Jin T, Wang J. Osteoprotegerin polymorphisms are associated with alcohol-induced osteonecrosis of femoral head in Chinese Han population from Henan province. *J Genetic* 2016;95:983-989.
25. Montañez-Barragán A, Gómez-Barrera I, Sanchez-Niño MD, Ucerro AC, González-Espinoza L, Ortiz A. Osteoprotegerin and kidney disease. *J Nephrol* 2014;27:607-617.
26. Galeone A, Paparella D, Colucci S, Grano M, Brunetti G. The role of TNF- α and TNF superfamily members in the pathogenesis of calcific aortic valvular disease. *ScientificWorldJournal* 2013:1-10.
27. Jia P, Wu N, Jia D, Sun Y. Association between Osteoprotegerin gene polymorphisms and risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis. *Balkan J Med Genet* 2017;20:27-33.
28. Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur J Biochem* 1998;254:685-691.

29. Özkalaycı F, Gülmez Ö, Uğur-Altun B, Pandi-Perumal SR, Altun A. The Role of Osteoprotegerin as a Cardioprotective Versus Reactive Inflammatory Marker: the Chicken or the Egg Paradox. *Balkan Med J* 2018;35:225.
30. Roskamp L, Trevilatto P, Souza C, Silva Neto U, Carneiro E, Fariniuk L, Westphalen VPD. Analysis of the association of clinical factors and il4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J* 2018;51.1:12-19.
31. Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res Appl* 2014;10:264-296.
32. Sun X, Zhang J. Identification of putative pathogenic SNPs implied in schizophrenia-associated miRNAs. *BMC Bioinformatics* 2014;15:2-9.
33. Köberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Arch Toxicol* 2016;90:2369-2388.
34. Doetzer AD, Schlipf N, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Werneck R, Riess O et al. Lactotransferrin Gene (LTF) Polymorphisms and Dental Implant Loss: A Case-Control Association Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17:e550-e561.
35. Trevilatto P, Line S. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:6-9.
36. Aida M, Line SRP. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18:148-152.
37. Hourfar J, Kanavakis G, Goellner P, Ludwig B. Fully customized placement of orthodontic miniplates: a novel clinical technique. *Head Face Med* 2014;10:2-7.
38. Papadopoulos M, Papageorgiou S, Zogakis I. Clinical effectiveness of orthodontic miniscrew implants: a meta-analysis. *J Dent Res* 2011;90:969-976.

39. Albogha MH, Kitahara T, Todo M, Hyakutake H, Takahashi I. Predisposing factors for orthodontic mini-implant failure defined by bone strains in patient-specific finite element models. *Ann Biomed Eng* 2016;44:2948-2956.
40. Motoyoshi M, Yoshida T, Ono A, Shimizu N. Effect of cortical bone thickness and implant placement torque on stability of orthodontic mini-implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2007;22.5:779-784.
41. Romano FL, Consolaro A. Why are mini-implants lost: The value of the implantation technique! *Dental Press J Orthod* 2015;20:23-29.
42. Park HS. Clinical study on success rate of microscrew implants for orthodontic anchorage. *Korean J Orthod* 2003;33:151-156.
43. Miyawaki S, Koyama I, Inoue M, Mishima K, Sugahara T, Takano-Yamamoto T. Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:373-378.
44. Baek S-H, Kim B-M, Kyung S-H, Lim JK, Kim YH. Success rate and risk factors associated with mini-implants reinstalled in the maxilla. *Angle Orthod* 2008;78:895-901.
45. Babür C, Özcan G, Çebi DU, Pervane B, Özdemir B, Yücel A et al. Gingival crevicular fluid levels of osteoprotegerin (OPG) in premenopausal and postmenopausal women with or without chronic periodontitis. *J Dent* 2012;40:364-371.
46. Ney JT, Juhasz-Boess I, Gruenhage F, Graeber S, Bohle RM, Pfreundschuh M, Solomayer EF, Assmann G. Genetic polymorphism of the OPG gene associated with breast cancer. *BMC Cancer* 2013;13:2-10.
47. Park OJ, Shin SY, Choi Y, Kim MH, Chung CP, Ku Y, Kim KK. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. *Oral Dis* 2008;14:440-444.

48. Kadkhodazadeh M, Alizadeh Tabari Z, Ardakani MRT, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. *Eur J Oral Implantol* 2012;5.4:381-388.
49. Zhou J, Zhao Y. Osteoprotegerin gene (OPG) polymorphisms associated with peri-implantitis susceptibility in a Chinese Han population. *Med Sci Monit* 2016;22:4271-4276.
50. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012202.1?&feature=any Acess in: 21 de setembro de 2018
51. May A, Pettifor JM, Norris SA, Ramsay M, Lombard Z. Genetic factors influencing bone mineral content in a black South African population. *J Bone Miner Metab* 2013;31:708-716.

ANEXOS

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celcius
μl	Microlitro
<i>bins</i>	Blocos de desequilíbrio de ligação
bp	Pares de bases
CEU	Residentes de Utah com ascendência do Norte e da Europa Ocidental
DATs	Dispositivos de ancoragem temporária
DL	Desequilíbrio de Ligação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dbSNP	Banco de dados de SNPs
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
et al.	E colaboradores
FAM	Frequência alélica mínima
HCL	Ácido clorídrico
<i>IL-6</i>	Gene que codifica a proteína IL-6
IC	Intervalo de Confiança
kb	Quilobase
kDa	Kilodaltons
M	Molar
MI	Mini-implante
MIIs	Mini-implantes
mM	Milimolar

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OPG	Osteoprotegerina
<i>OPG</i>	Gene que codifica a proteína OPG
OR	<i>Oddis Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PH	Potencial hidrogeniônico
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RANKL	Receptor ativador ligante do fator nuclear kappa beta
rpm	Rotações por minuto
rs	<i>reference</i> SNP
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<i>tag</i> SNPS	SNPs representativos de um gene
TNFRSF11B	Família do receptor do fator de necrose tumoral 11B
Tris	Hidroximetil aminometano

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 2
Protocolo CONEP 0216.0.084.000-10	Pesquisador responsável Paula Cristina Trevilatto
Instituição PUCPR-CCBS - Curitiba	

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 – American Journal Of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics

Submit Original Articles via EES: <http://ees.elsevier.com/ajodo>.

Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video explaining how to prepare your article for submission, go to Video on Manuscript Preparation

1. Title Page. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers

2. Abstract. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 10th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann 30 Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references

with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per 4 cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. Tables. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word is preferred, Excel is accepted) and not as graphic elements. Do not use colors, shading, boldface, or italic in tables. Do not submit tables as parts A and B; divide into 2 separate tables. Do not "protect" tables by making them "read-only." The table title should be put above the table and not as a cell in the table. Similarly, table footnotes should be under the table, not table cells.

6. Model release and permission forms. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. Copyright release. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors: "The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed copyright release and submit it via EES

8. Use the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form). If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

9. Institutional Review Board approval. For those articles that report on the results of experiments or treatments where patients or animals have been used as the sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the manuscript submission.

Guidelines for Systematic Reviews

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be prepared according to contemporary PRISMA (Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses) standards. The AJO-DO will screen submissions for compliance before beginning the review process. To help authors understand and apply the standards,

we have prepared a separate Guidelines for AJO-DO Systematic Reviews and Meta-Analyses. This guide includes links to a Model Orthodontic Systematic Review and an accompanying Explanation and Elaboration document.

These guidelines are supplemental to the Guidelines for Original Articles, which describe how to meet general submission requirements, such as figure formats, reference style, required releases, and blinding.