



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

MARIA AUGUSTA ANDRIGO PERIN

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
GENE *RANKL* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES
ORTODÔNTICOS**

Curitiba
2019

MARIA AUGUSTA ANDRIGO PERIN

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
GENE *RANKL* 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 em Clínica Odontológica Integrada (Ênfase em Ortodontia).

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

Curitiba

2019

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pela oportunidade de estudar através do consentimento da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, na figura da Prof. Dra. Renata Iani Werneck pelo acolhimento decisivo em minha trajetória acadêmica.

À Prof. Dra. Paula Cristina Trevilatto, pela oportunidade, confiança, dedicação e carinho para com seus orientados. Exemplo de competência e carisma.

Ao Prof. Dr. Alexandre Reichow, Prof. Dr. Bruno Castilhos e às colegas Thaís Munhoz Pereira e Laysa Toschi Martins, pela dedicação nas etapas decisivas para que esse trabalho fosse possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva de viver e poder desfrutar tantos momentos especiais de aprendizado e crescimento pessoal como esse.

À minha família, em especial minha mãe Leandra, por ser a pessoa que mais me incentiva, apoia e que está por trás de todo o suporte necessário para que os meus sonhos se tornem realidade.

Ao meu namorado Felipe, pelo companheirismo de todas as horas, pela paciência, carinho, ensinamentos e principalmente por seu amor e o fruto que ele gerou.

A minha colega Laís Giacobbo minha fiel escudeira nesses dois anos. Com certeza foi um presente muito especial ter te conhecido e poder dividir tantos desafios e aprendizados ao seu lado. Amizade verdadeira que quero levar para toda vida.

Aos meus professores: Prof. Dra. Elisa S. Camargo, Prof. Dr. Odilon Guariza Filho e Prof. Dr. Orlando Tanaka, pela imensa contribuição em minha formação. São exemplos de pessoas e profissionais a serem seguidos.

Aos meus colegas da 11ª turma por toda a amizade nesse período. Foi um privilégio fazer parte dessa turma tão querida.

A todas as pessoas que fazem parte do programa de Pós-graduação PUCPR, em especial à Neide Reis Borges e Irenice Caio da Silva pela prontidão em nos ajudar.

A Faculdade ILAPEO, em especial às professoras Ana Cláudia Moreira Melo e Isabela Shimizu, pelo acolhimento e orientação.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
PÁGINA TÍTULO.....	1
RESUMO	2
INTRODUÇÃO	3
Ortodontia e mini-implantes.....	3
Metabolismos ósseo.....	4
Ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANKL).....	5
MATERIAS E MÉTODOS.....	7
Seleção da amostra.....	7
Obtenção e purificação do DNA.....	7
Análise de polimorfismos no gene candidato funcional.....	8
Análise estatística.....	8
RESULTADOS.....	9
Variáveis clínicas e sociodemográficas.....	9
Análise de <i>tagSNPs</i> no gene <i>RANKL</i>	11
DISCUSSÃO.....	14
CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO EM INGLÊS.....	23
ANEXOS.....	45
Lista de abreviaturas e siglas.....	45
Parecer do comitê de ética.....	47
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	48

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO
GENE *RANKL* COM A PERDA DE MINI-IMPLANTES
ORTODÔNTICOS**

Maria Augusta Andrigo Perin

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

RESUMO

Objetivo: Esse estudo objetivou a investigação da associação de polimorfismos no gene *RANKL* com a perda de mini-implantes usados para ancoragem ortodôntica.

Materiais e Métodos: A amostra foi constituída de 135 pacientes de ambos sexos com idade média de $48,7 \pm 10$ anos. No grupo controle foram alocados os pacientes que não apresentaram perdas de MIs e que estiveram por pelo menos 6 meses em função. O grupo caso foi composto por 31 pacientes que apresentaram pelo menos um MI perdido durante o tratamento. O DNA foi coletado de células epiteliais do meio bucal a partir de bochecho com solução de glicose 3% e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada. A genotipagem foi realizada pela Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR). Os polimorfismos do gene candidato foram escolhidos com base no *International HapMap Project*, totalizando quatro polimorfismos do tipo *tag*SNP: rs10388434, rs3742257, rs931273 e rs12585229, com frequência alélica mínima de 0,05 na população CEU e $r^2 > 80\%$. *Resultados:* Nenhum dos *tag*SNPs estudados: rs3742257, rs931273 e rs12585229 associaram-se com a perda de MIs ortodônticos, sendo que um deles (rs10388434) não amplificou. *Conclusão:* As variáveis genéticas estudadas não demonstraram associação com a perda de mini-implantes ortodônticos. Na população estudada, os rs931273 e rs12585229 apresentaram-se em alto desequilíbrio de ligação ($r^2 > 80$), sendo possível analisar somente um deles em futuras pesquisas.

Palavras-Chave: Procedimentos de Ancoragem Ortodôntica, Implantes dentários, Polimorfismo Genético

INTRODUÇÃO

Ortodontia e mini-implantes

O controle de ancoragem é uma das principais questões que determinam o sucesso do tratamento ortodôntico. Muito se tem estudado acerca de dispositivos que cumpram esse papel de forma efetiva e com menos efeitos colaterais indesejáveis.(1) A partir das descobertas de Bränemark(2,3) sobre a osseointegração, os dispositivos de ancoragem esquelética se desenvolveram rapidamente e tornaram-se amplamente utilizados na prática clínica,(4,5) mostrando maior eficácia do que os métodos de ancoragem convencionais.(6,7)

Mini-implantes (MIs) são dispositivos intraósseos temporários usados em situações nas quais a biomecânica ortodôntica complexa é necessária.(8) Desde a sua introdução, o uso de MIs ganhou popularidade devido à sua facilidade de instalação e remoção, seu baixo custo e possibilidade de carga imediata após a instalação. Estudos demonstram que se uma ancoragem máxima é necessária, MIs devem ser o sistema a ser adotado.(9-12)

MIs mostram-se efetivos para ancoragem, mas seu sucesso depende de inúmeros fatores,(13,14) como: estabilidade mecânica,(15) quantidade de carga(16) e momento da aplicação de força,(17) comprimento(18) e diâmetro do mini-implante,(19,20) quantidade óssea disponível,(21) espessura gengival, local de inserção,(22) idade e sexo,(23) padrão esquelético facial vertical,(24) hábitos de higiene e colonização bacteriana peri-implantar,(25) hábitos de fumo(26), presença de inflamação,(27) e *background* genético.(28) A média da taxa de sucesso dos MIs varia de 80% a 89,1%. (29-32)

Forças de diferentes naturezas são aplicadas sobre os dispositivos usados para ancoragem. A estabilidade e sobrevida do MI frente a forças contínuas, dinâmicas e rotacionais(33) é dependente, dentre outros fatores, da possível osseointegração primária. Esse fenômeno é resultante da significativa proliferação óssea sobre o MI(34), ocorrendo mesmo que o objetivo de sua manutenção seja de cunho temporário.

A partir da determinação do plano de tratamento, com a necessidade de ancoragem absoluta, a perda precoce inesperada do MI é considerada clinicamente importante(35,36), pois implicará no replanejamento do caso e prolongamento do tempo de tratamento.(30,37)

Metabolismo ósseo

O processo dinâmico no qual a estrutura óssea é acometida durante toda vida, visa a integridade estrutural e homeostase mineral do tecido.(38) Para tal, o processo predominante de remodelação óssea ocorre para assegurar a manutenção do sistema esquelético.

Basicamente, a remodelação óssea acontece a partir de dois processos: reabsorção e deposição óssea.(39,40) O mecanismo de remodelação óssea é executado principalmente por osteoblastos e osteoclastos, sendo introduzido por fatores locais e sistêmicos.(41)

Por sua vez, osteoblastos são células especializadas responsáveis pela neoformação óssea e que exercem papéis importantes, como a expressão de fatores osteoclastogênicos, produção de proteínas da matriz óssea e mineralização óssea.(42) Já os osteoclastos são células grandes e multinucleadas, derivadas de monócitos e macrófagos, responsáveis pela reabsorção óssea.(39)

Quando forças são aplicadas sobre o MI em função da movimentação dentária, o processo inflamatório instala-se na região peri-implantar.(43) O equilíbrio desses eventos fortemente coordenados requer as atividades sincronizadas de múltiplos sistemas, tais como: células do processo imunológico, (44) dosagem hormonal(45) e expressão gênica.(46) Sabe-se muito a respeito do processo imunoinflamatório, porém esse mecanismo complexo ainda deixa lacunas no entendimento de aspectos relacionados à fisiopatogenia de desordens ósseas,(47) sendo essencial a maior compreensão para facilitar a terapêutica e a prevenção de doenças.

Ligante do receptor ativador nuclear kappa B (RANKL)

O RANKL, membro da superfamília do fator de necrose tumoral (codificado pelo gene *TNFSF11B*(48), é uma glicoproteína (citocina) hidrofílica localizada na membrana celular(49) dos osteoclastos. Tem como função a regulação das atividades de diferenciação, proliferação, ativação e comunicação intercelular, a partir da ligação com receptores específicos, ao reconhecer a presença de antígenos ou corpos estranhos(50), podendo elevar ou reduzir a resposta imunoinflamatória do hospedeiro.(51)

As células do sistema imune, conhecidas como linfócitos, demonstraram relação direta na diferenciação e ativação de osteoclastos pois são responsáveis por secretar citocinas, como por exemplo o RANKL, ao mesmo tempo que inibem o desenvolvimento dessas mesmas células.(52)

A regulação chave para o processo de manutenção do equilíbrio ósseo está na interação entre RANK/RANKL/OPG. Quando o ligante RANKL adere-se ao receptor RANK, isso resulta na ativação dos osteoclastos até a sua maturação, capacitando-o a desintegrar matéria óssea. Outro mediador presente nesse mecanismo é a osteoprotegerina (OPG), inibidora da reabsorção óssea, ao concorrer com o receptor RANK, impedindo assim a interação com o RANKL, evitando o desenvolvimento e ativação dos osteoclastos, e consequentemente a reabsorção óssea.(53-57) Ao final dos anos noventa, foi descrito na literatura um importante estudo sobre a associação entre a citocina RANKL e a reabsorção óssea, destacando a sua significativa influência nesse processo.(58)

O gene *RANKL* é o codificador da citocina RANKL e está localizado no braço longo do cromossomo 13, na região 13q14,(59) sendo composto por 8 éxons e íntros intermediários.(60) Recentes descobertas do mapeamento do genoma humano possibilitaram a elucidação de marcadores genéticos de susceptibilidade (61) em estudos de diversas doenças, incluindo as envolvidas em desequilíbrios do metabolismo ósseo.(62,63) Nesses estudos epidemiológicos, a associação entre polimorfismos genéticos e características fenotípicas de determinada população foi analisada.(64) Assim, é possível investigar o papel dos genes candidatos e eventuais interações de alelos com fatores de risco ambientais.(65, 66)

Polimorfismos de base única ou *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) são variações no DNA com alteração de um único nucleotídeo na sequência do genoma, gerando alelos comuns na população com frequência mínima de 1%. A abundância de polimorfismos no genoma humano os transformam em alvo para explicar a variabilidade genética e sua influência no risco e progressão de algumas doenças e condições categorizadas complexas. Polimorfismos, quando localizados em uma região codificadora do gene, podem promover variações na produção de citocinas, assim como podem alterar aminoácidos e modificar a função da proteína codificada.(67)

Estudos em pacientes tratados com implantes demonstrou a associação dos níveis de RANKL como biomarcadores no prognóstico da peri-implantite, sugerindo que o processo inflamatório poderia ocasionar a perda dos implantes dentários.(68, 69) Os mesmos achados são relatados em outro estudo, no qual a destruição óssea na doença periodontal esteve correlacionada aos níveis positivos de RANKL.(70)

Há pouca investigação na literatura relacionando perda de implantes(71-73) e MIs com fatores genéticos (28) Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi investigar a associação entre polimorfismos no gene *RANKL* e a perda de MIs ortodônticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção da amostra

Para esse estudo de modelo coorte, foram analisados 148 prontuários do Faculdade ILAPEO, Curitiba, PR, Brasil, de pacientes que foram tratados com MIs ortodônticos (NEODENT® Implante Osteointegrável) a partir de 2004. O "n" amostra final foi de 135 pacientes, pois 5 pacientes recusaram-se a participar da pesquisa e 8 não foram incluídos por apresentar condições como sífilis, gravidez ou lactação. No grupo controle, foram alocados os pacientes que não apresentaram perdas de MIs e que estiveram por pelo menos 6 meses em função. O grupo caso foi composto por 31 pacientes que apresentaram pelo menos um MI perdido durante o tratamento. Esse estudo foi desenvolvido com pacientes de ambos sexos e sem restrições quanto à faixa etária. No grupo controle foram alocados os pacientes que não apresentaram perda de MI, permanecendo em função por pelo menos 6 meses.

O número de MIs instalados e perdidos foi obtido a partir da ficha clínica dos pacientes. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, protocolo 5693/10.

Obtenção e purificação do DNA

Células epiteliais foram coletadas por meio de bochecho com solução de glicose 3% e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada, a qual foi agitada dentro da solução após retorno para um copo plástico. (74) Na fase laboratorial, as células coletadas foram sedimentadas por centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos. Logo após, 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]. Foi adicionada à solução 10 µl de proteinase K (20 mg/ml), deixada por uma noite à 65°C. O DNA foi purificado, pela adição de acetato de amônio 10 M, seguido de precipitação com isopropanol e ressuspensão com 50 µl de Tris 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1 mM. (75)

Análise de polimorfismos no gene candidato funcional

Os polimorfismos do gene candidato proposto foram escolhidos com base no *International HapMap Project* (<http://www.hapmap.org>), no total de quatro polimorfismos do tipo *tag*SNP: rs10388434, rs3742257, rs931273 e rs12585229. Os *tag*SNPs são polimorfismos-chave que representam os genes candidatos como um todo, considerando *bins* [blocos de alto desequilíbrio (DL) de ligação calculados por $r^2 > 0,8$].

Os marcadores selecionados apresentam frequência alélica mínima de 0,05 na população CEU, composta pelos descendentes do norte e oeste da Europa, consistente com a descendência europeia da população estudada, de acordo do senso demográfico brasileiro (2010), 70% dos paranaenses eram caucasianos.

O DNA purificado dos pacientes foi amplificado pela Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR) [*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA)*]. A genotipagem com utilização da tecnologia *TaqMan™ Genotyping Master Mix (Applied Biosystems)* foi realizada para a identificação dos polimorfismos.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS, versão 20.0. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (95% IC) foram determinados quando possível. O programa Haploview 4.1 foi utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação.

Variáveis nominais foram apresentadas como frequência e porcentagem. O teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar as diferenças entre os grupos entre variáveis categóricas. Os seguintes modelos genéticos de associação entre os marcadores (*tag*SNPs) foram avaliados: modelos dominante e recessivo, pelo teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, e o modelo aditivo, pelo teste de regressão logística binária.

RESULTADOS

Variáveis clínicas e sociodemográficas

O índice de sucesso do tratamento com MIs foi de 87,5%. As variáveis idade, gênero, hábitos de fumo, hábitos de higiene, índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD) e índice comunitário periodontal das necessidades de tratamento (CPITN) podem ser encontradas na Tabela 1. Os parâmetros clínicos: posição, diâmetro, comprimento, tipo de cinta e tipo de ancoragem são descritos na Tabela 2. Ambas as tabelas foram retiradas do trabalho de Reichow, *et al.* 2016.(28)

Tabela 1. Resultados da análise univariada, considerando as variáveis clínicas e sociodemográficas para os grupos caso e controle.

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**	
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						
1 ou 2	27	26,0	0	0,0	0,001*	
3, 4 ou 5	77	74,0	31	100,0		

*Teste Exato de Fischer

**Teste t de Student

FONTE: Reichow AM, Melo AC, de Souza CM, Castilhos BB, Olandoski M, Alvim-Pereira CC, et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2016;45(5):649-57.

Tabela 2. Resultados da análise univariada, considerando as variáveis técnicas dos mini-implantes ortodônticos (n=311).

Dados MI	Grupo Controle n=272 %		Grupo Estudo n=39 %		Valor de p	OR (IC 95%)
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	0,890*	
Palatina	42	89,36	5	10,64		
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		
5,0	9	90,00	1	10,00	0,948*	
7,0	145	86,83	22	13,17		
9,0	82	87,23	12	12,77		
11,0	36	90,00	4	10,00		
Tipo de cinta^{&}	272	100,00	39	100,00		
CB (cinta baixa)	116	89,92	13	10,08	0,542*	
CM (cinta média)	125	85,62	21	14,38		
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	0,109*	
Verticalização	54	79,41	14	20,59		
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 AM, Melo AC, de Souza CM, Castilhos BB, Olandoski M, Alvim-Pereira CC, et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2016;45(5):649-57.

Análise de *tag*SNPs no gene *RANKL*

A distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos estudados no grupo controle apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pode-se constatar que os SNPs rs931273 e rs12585229 estão em alto desequilíbrio de ligação (Figura 1).

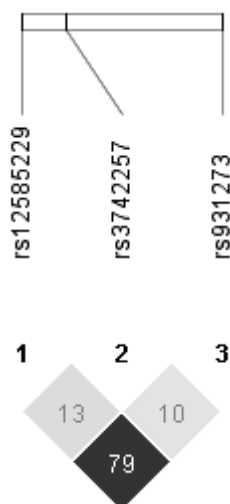


Figura 1. Mapa de desequilíbrio de ligação (DL) entre os *tag*SNPs do gene do *RANKL*. Os números dentro dos quadrados indicam a % em DL, e a intensidade de cor reflete o grau de DL entre dois *loci*, sendo a mais escura o maior DL entre os SNPs.

Os rs931273, rs372257, rs12585229 não apresentaram associação de proteção ou suscetibilidade à perda de MIs tanto nos modelos recessivo e dominante (Tabela 3) quanto no modelo aditivo (Tabela 4). Já o rs10388434 não pode ser avaliado, pois não amplificou, possivelmente por desenho inadequado dos *primers*.

Tabela 3. Resultados da análise univariada dos *tagSNPs* do gene *RANKL* para os modelos dominante e recessivo para os grupos caso e controle (n=135).

<i>TagSNPs db SNP ID^a</i>	<i>Alelos^{&}</i>	<i>Grupos</i>	<i>Genótipos</i>	<i>Genótipos</i>	<i>p- valor*</i>	<i>OR (IC 95%)</i>
rs3742257 (Dom C) n= 133	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,391**	0,736 (0,253-2,146)
		Caso	81 (78,6) 25 (83,3)	22 (21,4) 5 (16,7)		
rs3742257 (Rec C) n = 133	[C/T]	Controle	CT+TT	CC	0,814	1,109 (0,467-2,638)
		Caso	71 (68,9) 20 (66,7)	32 (31,1) 10 (33,3)		
rs12585229 (Dom C) n=132	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,662**	1,089 (0,109-10,859)
		Caso	98 (97,0) 30 (96,8)	3 (3,0) 1 (3,2)		
rs12585229 (Rec C) n=132	[C/T]	Controle	CT+TT	CC	0,994	0,997 (0,397-2,501)
		Caso	26 (25,7) 8 (25,8)	75 (74,3) 23 (74,2)		
rs931273 (Dom C) n= 133	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,659**	1,100 (0,110-10,969)
		Caso	99 (97,1) 30 (96,8)	3 (2,9) 1(3,2)		
rs931273 (Rec C) n=133	[C/T]	Controle	CT+TT	CC	0,554	1,314 (0,531-3,254)
		Caso	32 (31,4) 8 (25,8)	70 (68,6) 23 (74,2)		

^aIdentificador de SNP baseado no dbSNP do NCBI

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

OR, Odds Ratio;

IC, Intervalo de Confiança;

*Qui-quadrado de Pearson,

**Teste Exato de Fisher.

Tabela 4. Resultado da análise univariada dos *tagSNPs* do gene *RANKL* para o modelo aditivo para os grupos caso e controle (n=135).

<i>TagSNPs</i> ^a	Variação ^{&} [1/2]	Genótipos	Grupo Controle	Grupo Caso	<i>p</i> -valor*	OR (IC 95%)
rs931273	[C/T]	CC	70 (68,6)	23 (74,2)	0,990	0,986 (0,098 - 9,947)
		CT	29 (28,4)	7 (22,6)	0,793	0,724 (0,065-8,054)
		TT	3 (2,9)	1 (3,2)	0,814	
rs3742257	[C/T]	CC	32 (31,1)	10 (33,3)	0,604	1,375 (0,413-4,579)
		CT	49 (47,6)	15 (50,0)	0,606	1,347 (0,435-4,171)
		TT	22 (21,4)	5 (16,7)	0,854	
rs12585229	[C/T]	CC	75 (74,3)	23 (74,2)	0,944	0,920 (0,091-9,277)
		CT	23 (22,8)	7 (22,6)	0,941	0,913 (0,82-10,228)
		TT	3 (3,0)	1 (3,2)	0,997	

^aIdentificador de SNP baseado no dbSNP do NCBI;

OR, Odds Ratio;

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

IC, Intervalo de Confiança;

*Regressão logística binária

DISCUSSÃO

A possível perda precoce de um mini-implante durante o tratamento ortodôntico, pode afetar o planejamento e prolongar o tempo de tratamento.(17, 37) Sendo assim, muitos trabalhos acerca da identificação dos fatores relacionados ao sucesso da técnica vêm sendo relatados. A taxa de sucesso do estudo de Reichow foi de 87,5%, valor muito próximo ao encontrado por outros autores.(29-32)

Para a variável idade, valores estatisticamente significantes não foram encontrados quando 227 MIs ortodônticos foram estudados.(27) Contudo, Lee *et al.* sugerem que pacientes com idade inferior a 20 anos se enquadram em um grupo de alto risco para perda dos MIs(23), concordando com Motoyoshi *et al.*, que demonstram taxas de sucesso maiores em adultos do que em adolescentes.(1) Por outro lado, fatores genéticos descritos em modelo animal, evidenciaram acentuada expressão de RANKL e perda óssea conforme o avançar da idade,(76) fato que pode comprometer a estabilidade do dispositivo. Alta taxa de sucesso foi observada no estudo de Reichow *et al.*(28), sendo a mesma amostra do presente estudo, no qual a faixa etária variou entre 20 e 76 anos.

Sabe-se que o sucesso dos MIs ortodônticos usados para ancoragem está condicionado a causas multifatoriais, inclusive genéticas.(13-27,71) A pesquisa atual estudou a associação de polimorfismos no gene *RANKL* com a perda de MIs ortodônticos.

Polimorfismos no gene *RANKL* podem influenciar os níveis de expressão de proteína, intensificando o processo de osteoclastogênese.(77) Ademais, muitos são os fatores em nível celular e molecular que contribuem para o processo de reabsorção óssea.(41) Os polimorfismos deste estudo encontram-se em regiões intrônicas correspondente à áreas de DNA que estão envolvidas somente no processo de transcrição, não sendo traduzidas em proteínas. Entretanto, o rs2148073 do gene *RANKL* foi estudado em relação ao índice de compressão do colo do fêmur, um novo parâmetro fenotípico para detectar a densidade óssea e potencial para fratura de quadril. O polimorfismo associou-se significativamente.(78)

Cheng *et al.* detectaram alto desequilíbrio de ligação entre os rs3742257 e rs922996 ($d'=0,92$, $r^2=0,94$), optando pela genotipagem somente do segundo

polimorfismo. Das 457 mulheres taiwanesas estudadas, foi possível constatar que as pacientes que não apresentaram alelos G/rs2148072, C/rs2200287, G/rs922996 tiveram maior risco à baixa densidade mineral pós-menopausa (OR= 2.09, 95%, CI=1,21-3,64). Os autores também ressaltam que esses três SNPs estão localizados em região de íntron e, assim, não afetariam a codificação de proteínas.(79)

Spencer *et al.* estudaram a idade da menarca e da menopausa, pois podem estar associadas ao câncer, doenças cardiovasculares e ateropatias. Em uma amostra 1.860 mulheres afro-americanas, foram avaliados 161.098 SNPs. Os polimorfismos rs3826620 (*RANK*) e rs931273 (*RANKL*) apresentaram-se em fraco desequilíbrio de ligação, não demonstrando significância para esta amostra.(64)

Entretanto, no presente estudo, alto desequilíbrio de ligação entre os *tag*SNPs rs931273 e rs12585229 foi detectado. Assim, para próximos estudos de *bins* na poluição brasileira, sugere-se a genotipagem de somente um dos dois polimorfismos, reduzindo tempo e investimento para o desenvolvimento da pesquisa, ao mesmo tempo que alcançará efetiva captura da informação genética.

Estudo realizado por Wang *et al.*, avaliou as possíveis diferenças entre 41 polimorfismos dos genes *TNFSF11*, *TNFRSF11A* e *TNFRSF11B* do sistema *RANK/RANKL/OPG*, em relação a osteopatias. A população Mongol foi comparada com mais outras cinco populações: chineses Han (Pequim-China), japoneses (Tóquio-Japão), população do norte e oeste da Europa (CEU), Yoruba (Ibadan-Nigéria) e população Han do noroeste Chinês, usando testes de qui-quadrado e análise de haplótipos. Foi possível concluir que há diferenças significativas entre polimorfismos dos genes *TNFSF11* (*RANKL*) na população CEU e Yoruba quando comparadas com os mongóis, diferentemente das populações chinesa, japonesa e dos descendentes do noroeste Chinês.(48)

Os *tag*SNPs no gene *RANKL*, rs931273 e rs12585229 não se mostraram associados com a perda de mini-implantes ortodônticos, assim como no estudo realizado na população chinesa onde a densidade mineral óssea foi avaliada.(34)

Lu *et al.* encontraram associação de três polimorfismos no gene *RANKL*: rs2200287 ($p=0,005$), rs9525641 ($p=0,039$) e rs1054016 ($p=0,047$), com relação à idade da menarca, ao analisar 19 SNPs do *TNFRSF11* em uma amostra aleatória de 306 mulheres brancas não aparentadas.(80) Sabe-se que a quantidade de

hormônios durante a menarca muda drasticamente, e que hormônios exercem papéis importantes na expressão do gene *TNFRSF11A* e *TNFSF11*.(81) Assim, os autores sugerem que, em períodos em que haja mudanças significativas na quantidade de hormônios, também poderiam resultar diretamente na atividade dos genes.(80)

Estão descritos na literatura possíveis mecanismos para a inibição da citocina RANKL, pois a redução dessa citocina diminuiria o desenvolvimento de tumores esqueléticos e câncer de mama.(53, 56) Em outro estudo, a diminuição de RANKL e aumento de OPG resultaria em menor reabsorção óssea no tratamento de doenças malignas e ocorrências pós-menopausa.(55)

Esse trabalho é o primeiro a investigar a associação de polimorfismos no gene *RANKL* com a perda de mini-implantes ortodônticos. Mesmo que os achados desse estudo não demonstrem associação genética com a perda de MIs, o gene *RANKL* é um candidato em potencial para o desenvolvimento de condições relacionadas ao metabolismo ósseo, uma vez que, em outros estudos associou-se à peri-implantite(82), osteoporose(77), arteropatia, doença periodontal, (34) metástase óssea e câncer de mama.(54)

A hipótese de que a perda de MIs é resultado de causas multifatoriais e que polimorfismos genéticos representam um dos fatores de risco associados foi sugerida pelo estudo de Reichow *et al.* 2016, o qual investigou a associação de polimorfismos no gene *IL6* com a perda dos dispositivos intraósseos.(28) Contudo, ainda são escassas as pesquisas que investigam a associação de fatores genéticos com a perda de MIs ortodônticos. Ainda, é importante a replicação desses estudos em outras populações com uma maior quantidade de participantes.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- 1) Nenhum dos *tag*SNPs estudados (rs3742257, rs931273 e rs12585229) se associou com a perda de MIs ortodônticos.
- 2) Na população estudada, os rs931273 e rs12585229 estiveram em alto desequilíbrio de ligação, podendo somente um deles ser utilizado no estudo de *bins* na população brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Motoyoshi M. Clinical indices for orthodontic mini-implants. *Journal of oral science*. 2011;53(4):407-12.
2. Turley PK, Kean C, Schur J, Stefanac J, Gray J, Hennes J, et al. Orthodontic force application to titanium endosseous implants. *The Angle orthodontist*. 1988;58(2):151-62.
3. Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *American journal of orthodontics*. 1984;86(2):95-111.
4. Costello BJ, Ruiz RL, Petrone J, Sohn J. Temporary skeletal anchorage devices for orthodontics. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2010;22(1):91-105.
5. Sugawara J. Temporary skeletal anchorage devices: the case for miniplates. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2014;145(5):559-65.
6. Antoszewska-Smith J, Sarul M, Lyczek J, Konopka T, Kawala B. Effectiveness of orthodontic miniscrew implants in anchorage reinforcement during en-masse retraction: A systematic review and meta-analysis. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2017;151(3):440-55.
7. Reynders RM, Ladu L. Mini-implants for orthodontic anchorage. *Evidence Based Dentistry*. 2017;18:82.
8. Alves M, Jr., Baratieri C, Mattos CT, Araujo MT, Maia LC. Root repair after contact with mini-implants: systematic review of the literature. *European journal of orthodontics*. 2013;35(4):491-9.
9. Feldmann I, Bondemark L. Anchorage capacity of osseointegrated and conventional anchorage systems: a randomized controlled trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2008;133(3):339.e19-28.
10. Sandler J, Murray A, Thiruvenkatachari B, Gutierrez R, Speight P, O'Brien K. Effectiveness of 3 methods of anchorage reinforcement for maximum anchorage in adolescents: A 3-arm multicenter randomized clinical trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2014;146(1):10-20.
11. Nosouhian S, Rismanchian M, Sabzian R, Shadmehr E, Badrian H, Davoudi A. A Mini-review on the Effect of Mini-implants on Contemporary Orthodontic Science. *Journal of international oral health : JIOH*. 2015;7(Suppl 1):83-7.
12. Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *Journal of clinical orthodontics : JCO*. 1997;31(11):763-7.
13. Antoszewska J, Papadopoulos MA, Park HS, Ludwig B. Five-year experience with orthodontic miniscrew implants: a retrospective investigation of factors influencing success rates. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009;136(2):158.e1-10; discussion -9.

14. Yao CC, Chang HH, Chang JZ, Lai HH, Lu SC, Chen YJ. Revisiting the stability of mini-implants used for orthodontic anchorage. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2015;114(11):1122-8.
15. Marquezan M, Mattos CT, Sant'Anna EF, de Souza MM, Maia LC. Does cortical thickness influence the primary stability of miniscrews?: A systematic review and meta-analysis. *The Angle orthodontist*. 2014;84(6):1093-103.
16. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yu WJ. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: a systematic review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009;135(3):284-91.
17. Jeong JW, Kim JW, Lee NK, Kim YK, Lee JH, Kim TW. Analysis of time to failure of orthodontic mini-implants after insertion or loading. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;41(5):240-5.
18. Sarul M, Minch L, Park HS, Antoszewska-Smith J. Effect of the length of orthodontic mini-screw implants on their long-term stability: a prospective study. *The Angle orthodontist*. 2015;85(1):33-8.
19. Shah AH, Behrents RG, Kim KB, Kyung HM, Buschang PH. Effects of screw and host factors on insertion torque and pullout strength. *The Angle orthodontist*. 2012;82(4):603-10.
20. Yoo SH, Park YC, Hwang CJ, Kim JY, Choi EH, Cha JY. A comparison of tapered and cylindrical miniscrew stability. *European journal of orthodontics*. 2014;36(5):557-62.
21. Wilmes B, Drescher D. Impact of bone quality, implant type, and implantation site preparation on insertion torques of mini-implants used for orthodontic anchorage. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2011;40(7):697-703.
22. Kakali L, Alharbi M, Pandis N, Gkantidis N, Kloukos D. Success of palatal implants or mini-screws placed median or paramedian for the reinforcement of anchorage during orthodontic treatment: a systematic review. *European journal of orthodontics*. 2018.
23. Lee SJ, Ahn SJ, Lee JW, Kim SH, Kim TW. Survival analysis of orthodontic mini-implants. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2010;137(2):194-9.
24. Moon CH, Park HK, Nam JS, Im JS, Baek SH. Relationship between vertical skeletal pattern and success rate of orthodontic mini-implants. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2010;138(1):51-7.
25. Ferreira NO, Andrucio MC, Nelson-Filho P, Zanella EP, Consolaro A, Romano FL, et al. Bacterial biofilm on successful and failed orthodontic mini-implants--a scanning electron microscopy study. *Microscopy research and technique*. 2015;78(12):1112-6.
26. Mundt T, Schwahn C, Biffar R, Heinemann F. Changes in Bone Levels Around Mini-Implants in Edentulous Arches. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2015;30(5):1149-55.
27. Park HS, Jeong SH, Kwon OW. Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of*

- Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2006;130(1):18-25.
28. Reichow AM, Melo AC, de Souza CM, Castilhos BB, Olandoski M, Alvim-Pereira CC, et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2016;45(5):649-57.
 29. Dalessandri D, Salgarello S, Dalessandri M, Lazzaroni E, Piancino M, Paganelli C, et al. Determinants for success rates of temporary anchorage devices in orthodontics: a meta-analysis (n > 50). *European journal of orthodontics*. 2014;36(3):303-13.
 30. Melo AC, Andrighetto AR, Hirt SD, Bongioiolo AL, Silva SU, Silva MA. Risk factors associated with the failure of miniscrews - A ten-year cross sectional study. *Brazilian oral research*. 2016;30(1):e124.
 31. Rodriguez JC, Suarez F, Chan HL, Padial-Molina M, Wang HL. Implants for orthodontic anchorage: success rates and reasons of failures. *Implant dentistry*. 2014;23(2):155-61.
 32. Reynders R, Ronchi L, Bipat S. Mini-implants in orthodontics: a systematic review of the literature. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009;135(5):564.e1-19; discussion -5.
 33. Shin YS, Ahn HW, Park YG, Kim SH, Chung KR, Cho IS, et al. Effects of predrilling on the osseointegration potential of mini-implants. *The Angle orthodontist*. 2012;82(6):1008-13.
 34. Huja SS. Bone anchors--can you hitch up your wagon? *Orthodontics & craniofacial research*. 2015;18 Suppl 1:109-16.
 35. 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. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2003;124(4):373-8.
 36. Lim HJ, Eun CS, Cho JH, Lee KH, Hwang HS. Factors associated with initial stability of miniscrews for orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2009;136(2):236-42.
 37. Lee JH, Choo H, Kim SH, Chung KR, Giannuzzi LA, Ngan P. Replacing a failed mini-implant with a miniplate to prevent interruption during orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011;139(6):849-57.
 38. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(33):25103-8.
 39. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
 40. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5484):1504-8.
 41. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy reports*. 2014;3:481.

42. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. Annual review of genomics and human genetics. 2008;9:183-96.
43. Malkoc S, Ozturk F, Corekci B, Bozkurt BS, Hakki SS. Real-time cell analysis of the cytotoxicity of orthodontic mini-implants on human gingival fibroblasts and mouse osteoblasts. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2012;141(4):419-26.
44. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. Clinical biochemistry. 2012;45(12):863-73.
45. Tsourdi E, Rijntjes E, Kohrle J, Hofbauer LC, Rauner M. Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1. Endocrinology. 2015;156(10):3517-27.
46. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. Developmental cell. 2002;2(4):389-406.
47. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesi A, Ahluwalia TS, et al. Life-Course Genome-wide Association Study Meta-analysis of Total Body BMD and Assessment of Age-Specific Effects. American journal of human genetics. 2018;102(1):88-102.
48. Wang J, Wang Y, Zhao Y, Li Y, Sun M, Na R, et al. Polymorphisms of genes in the OPG/RANKL/RANK pathway in the Mongols of Inner Mongolia China: relationship to other populations. Int J Clin Exp Med. 2016;9(2):3851-9.
49. Balzarini J. Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. Nature reviews Microbiology. 2007;5(8):583-97.
50. Maruyama K, Sano G, Matsuo K. Murine osteoblasts respond to LPS and IFN-gamma similarly to macrophages. Journal of bone and mineral metabolism. 2006;24(6):454-60.
51. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. Revista brasileira de anestesiologia. 2011;61(2):255-9, 60-5, 137-42.
52. Arikan F, Buduneli N, Lappin DF. C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble RANKL, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: a case-control study. The International journal of oral & maxillofacial implants. 2011;26(2):282-9.
53. de Groot AF, Appelman-Dijkstra NM, van der Burg SH, Kroep JR. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors - A systematic review. Cancer treatment reviews. 2018;62:18-28.
54. Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. Gerontology. 2015;61(6):534-42.
55. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004;19(1):147-54.
56. Schieferdecker A, Voigt M, Riecken K, Braig F, Schinke T, Loges S, et al. Denosumab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL. Oncotarget. 2014;5(16):6647-53.
57. Bruhn-Olszewska B K-BA, Węgrzyn G, Jakóbkiewicz-Banecka J. Prevalence of polymorphisms in OPG, RANKL and RANK as potential markers for Charcot arthropathy development Scientific Reports | 7: 501 | DOI:10.1038/s41598-017-00563-4. <s41598-017-00563-4.pdf>.

58. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000;408(6812):600-5.
59. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nature genetics*. 2009;41(1):15-7.
60. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.
61. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996;380(6570):152-4.
62. Farhat SB, de Souza CM, Braosi AP, Kim SH, Tramontina VA, Papalexiou V, et al. Complete physical mapping of IL6 reveals a new marker associated with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2017;52(2):255-61.
63. Sophocleous A, Idris AI, Ralston SH. Genetic background modifies the effects of type 2 cannabinoid receptor deficiency on bone mass and bone turnover. *Calcified tissue international*. 2014;94(3):259-68.
64. Spencer KL, Malinowski J, Carty CL, Franceschini N, Fernández-Rhodes L, Young A, et al. Genetic variation and reproductive timing: African American women from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Study. *PLoS one*. 2013;8(2):e55258.
65. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *The Lancet Infectious diseases*. 2004;4(12):739-49.
66. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*. 2002;20:581-620.
67. Ban HJ, Heo JY, Oh KS, Park KJ. Identification of type 2 diabetes-associated combination of SNPs using support vector machine. *BMC genetics*. 2010;11:26.
68. Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M, et al. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *Journal of periodontology*. 2014;85(11):1566-74.
69. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Archives of oral biology*. 2013;58(5):530-6.
70. Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Archives of oral biology*. 2007;52(9):894-8.
71. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant dentistry*. 2014;23(6):723-31.
72. Montes CC, Alvim-Pereira F, de Castilhos BB, Sakurai ML, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clinical oral implants research*. 2009;20(2):208-17.
73. Ribeiro R, Melo R, Tortamano Neto P, Vajgel A, Souza PR, Cimoies R. Polymorphisms of IL-10 (-1082) and RANKL (-438) Genes and the Failure of Dental Implants. *International journal of dentistry*. 2017;2017:3901368.
74. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology*. 2000;18(1):6-9.

75. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148-52.
76. Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2003;18(2):270-7.
77. Sassi R, Sahli H, Cheour E, Sellami S, El Gaaied ABA. -643C > T RANKL gene polymorphism is associated with osteoporosis in Tunisian postmenopausal women. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society.* 2017;20(4):374-8.
78. Dong S-S, Liu X-G, Chen Y, Guo Y, Wang L, Zhao J, et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcified tissue international.* 2009;85(2):104-12.
79. Cheng B-H, Wang T-H, Kang H-Y, Lin Y-C, Huang C-C, Hsu T-Y, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the estrogen receptor 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand genes and bone mineral density in postmenopausal Taiwanese. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2013;52(2):197-203.
80. Lu Y, Liu P, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. *Menopause (New York, NY).* 2010;17(5):1048-54.
81. Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *European journal of endocrinology.* 2001;145(2):199-205.
82. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Archives of oral biology.* 2013;58(5):530-6.

ARTIGO EM INGLÊS

**ANALYSIS OF POLYMORPHISMS ASSOCIATION IN
RANKL GENE WITH A LOSS OF ORTHODONTIC MINI-
IMPLANTS**

Maria Augusta Andrigo Perin

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, School of Life Sciences,
Graduate Program in Dentistry, Orthodontic School.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the association of polymorphisms in the *RANKL* gene with the loss of mini-implants used for orthodontic anchoring. *Materials and Methods:* The sample consisted of 135 patients of both sexes with average age of 48.7 ± 10 years. In the control group, patients who did not suffer MI loss and were submitted for at least 6 months in function were allocated. The case group consisted of 31 patients who had at least one MI that was lost during treatment. DNA was collected from oral mucosa epithelial cells from the mouthwash with 3% glucose solution and scraped from the jugal mucosa with sterilized wooden spatula. Genotyping was performed by the Real-Time Polymerase Chain Reaction Technique (PCR). The polymorphisms of the candidate gene were chosen based on the International HapMap Project, totaling four tagSNPs type polymorphisms: rs10388434, rs3742257, rs931273 and rs12585229, with minimal allelic frequency of 0.05 in the CEU population and $r^2 > 80\%$. *Results:* None of the tagSNPs studied: rs374227, rs931273 and rs12585229 were associated with loss of orthodontic MIs, one of them (rs10388434) did not amplify. *Conclusion:* The genetic variables studied did not show any association with the loss of orthodontic mini-implants. In the studied population, the rs931273 and rs12585229 presented in linkage high disequilibrium ($r^2 > 80$), being possible to analyze only one of them in future researches.

Key words: Orthodontic Anchorage Procedures, Dental implants, Polymorphism, Genetics.

INTRODUCTION

Orthodontics and mini-implants

Anchoring control is one of the key issues that determine the success of orthodontic treatment. Much has been studied about devices that perform this role effectively and with fewer undesirable side effects.(1) From the discoveries of Bränemark (2,3) on osseointegration, skeletal anchoring devices developed rapidly, are widely used in clinical practice,(4,5) showing greater efficacy than conventional anchoring methods.(6,7)

Mini-implants (MIs) are temporary intraosseous devices used in situations in which complex orthodontic biomechanics are required.(8) Since its introduction, the use of MIs has gained popularity due to its ease of installation and removal, its low cost and possibility immediately after installation. Studies show that if maximum anchorage is required, MIs should be the system to be adopted.(9-12)

MIs are effective for anchorage, but their success depends on numerous factors,(13,14) with: mechanical stability,(15) amount of load(16) and moment of force application, (17) length,(18) and diameter of the mini-implant,(19,20) available bone quantity,(21) gingival thickness, insertion site,(23) age and sex,(24) vertical facial skeletal pattern,(25) hygiene habits and peri-bacterial colonization,(25) smoking habits,(26) presence of inflammation,(27) and genetic background.(28) The mean success rate of MIs ranges from 80% to 89.1%.(29-32)

Forces of different natures are applied on the devices used for anchoring. The stability and survival of MI against continuous, dynamic and rotational forces(33) is dependent, among other factors, on possible primary osseointegration. This phenomenon results from the significant bone proliferation on the MI(34), occurring even if the objective of its maintenance is of a temporary nature. From the determination of the treatment plan, with the need for absolute anchorage, the unexpected early loss of MI is considered clinically important(35, 36), as it will lead to replanning of the case and prolongation of treatment time.(30,37)

Bone metabolism

The dynamic process in which the bone structure is affected throughout life, aims at the structural integrity and mineral homeostasis of the tissue.(38) To this end, the predominant process of bone remodeling occurs to ensure the maintenance of the skeletal system.

Basically, bone remodeling occurs from two processes: bone resorption and bone formation.(38,40) The mechanism of bone remodeling is primarily performed by osteoblasts and osteoclasts, and is introduced by local and systemic factors.(41)

Osteoblasts are specialized cells responsible for bone neoformation and play important roles, such as the expression of osteoclastogenic factors, production of bone matrix proteins and bone mineralization.(42) Osteoclasts are large, multinucleated cells derived from monocytes and macrophages, responsible for bone resorption.(39)

When forces are applied to the MI as a function of tooth movement, the inflammatory process is installed in the peri-implant region.(43) The balance of these strongly coordinated events requires the synchronized activities of multiple systems, such as: cells of immune process(44) hormonal dosage(45) and gene expression.(46) Much is known about the immunoinflammatory process, but this complex mechanism still leaves gaps in the understanding of aspects related to the pathophysiology of bone disorders, (47) being essential the greater understanding to facilitate therapeutics and disease prevention.

Receptor activator of nuclear factor-KB ligand (RANKL)

RANKL, a member of the tumor necrosis factor superfamily (encoded by the TNFSF11B gene)(48), is a hydrophilic glycoprotein (cytokine) located on the cell membrane(49) of osteoclasts. Its function is to regulate the activities of differentiation, proliferation, activation and intercellular communication, from the binding with specific receptors, by recognizing the presence of antigens or foreign bodies (50), which may increase or reduce the immune-inflammatory response of the host.(51)

The cells of the immune system, known as lymphocytes, have shown a direct relationship in the differentiation and activation of osteoclasts, since they are responsible for secreting cytokines, such as RANKL, while inhibiting the development of these same cells.(52)

The key regulation for the bone balance maintenance process is in the interaction between RANK/RANKL/OPG. When the RANKL binder adheres to the RANK receptor, this results in the activation of osteoclasts until maturation, enabling it to disintegrate bone matter. Another mediator present in this mechanism is osteoprotegerin (OPG), inhibitor of bone resorption, when competing with the RANK receptor, thus preventing interaction with RANKL, avoiding the development and activation of osteoclasts, and consequently bone resorption. (53-57) At the end of the 1990s, an important study on the association between RANKL cytokine and bone resorption was described in the literature, highlighting its significant influence in this process.(58)

The *RANKL* gene is the cytokine encoder RANKL and is located on the long arm of chromosome 13, in the 13q14 region,(59) being composed of 8 exons and intermediates.(60) Recent discoveries of the mapping of the human genome enabled the elucidation of markers(61) in studies of various diseases, including those involved in imbalances of bone metabolism. (60, 61) In these epidemiological studies, the association between genetic polymorphisms and phenotypic characteristics of a given population was analyzed.(64) It is possible to investigate the role of candidate genes and possible allele interactions with environmental risk factors. (65,66)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are variations in DNA with single nucleotide changes in the genome sequence, generating common alleles in the

population with a minimum frequency of 1%. The abundance of polymorphisms in the human genome turns them into a target to explain genetic variability and its influence on the risk and progression of some complex categorized diseases and conditions. Polymorphisms, when located in a coding region of the gene, can promote variations in cytokine production, as well as alter amino acids and modify the function of the encoded protein.(67)

A study in patients treated with implants demonstrated the association of RANKL levels as biomarkers in the peri-implantite prognosis, suggesting that the inflammatory process could lead to the loss of dental implants.(68,69) The same findings are reported in another study in which bone destruction in periodontal disease was correlated with positive RANKL levels.(70)

There is little research in the literature relating loss of implants (71-73) and MIs(28) with genetic factors. Therefore, the objective of this research was to investigate the association between polymorphisms in the *RANKL* gene and the loss of orthodontic MIs.

MATERIALS AND METHODS

Sample selection

For this cohort model study, 148 medical records of the ILAPEO Faculty, Curitiba, PR, Brazil, were analyzed from 2004 onwards. The final "n" final sample of patients treated with orthodontic MIs (NEODENT® Osteointegrative Implant) was 135 patients, because 5 patients refused to participate in the study and 8 were not included because of conditions such as syphilis, pregnancy or lactation. In the control group, patients who did not present MI losses and who were at least 6 months in function were allocated. The case group consisted of 31 patients who had at least one MI that was lost during treatment. This study was developed with patients of both sexes and without age restrictions. In the control group, patients who did not present MI loss were allocated, remaining in function for at least 6 months.

The number of MIs installed and lost was obtained from the patients' clinical file. This project was approved by the Research Ethics Committee of PUCPR, protocol 5693/10.

Obtaining and purifying DNA

Epithelial cells were collected by means of a mouthwash with 3% glucose solution and scraping the jugal mucosa with a sterilized wooden spatula, which was agitated inside the solution after returning to a plastic cup.(74) In the laboratory phase, the collected cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. Subsequently, the supernatant was discarded and the cell pellet resuspended in 1300 µl extraction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM EDTA, 0.5% SDS]. 10 µl of proteinase K (20 mg / ml) was added to the solution, left overnight at 65°C. The DNA was purified by the addition of 10M ammonium acetate followed by precipitation with isopropanol and resuspension with 50µl of 10mM Tris (pH 7.6) and 1 mM EDTA.(75)

Analysis of polymorphisms in the functional candidate gene

The polymorphisms of the proposed candidate gene were chosen based on the International HapMap Project (<http://www.hapmap.org>), in total of four *tag*SNPs polymorphisms: rs10388434, rs3742257, rs931273 and rs12585229. The *tag*SNPs are key polymorphisms representing the candidate genes as a whole, considering bins [high linkage disequilibrium (DL) blocks calculated by $r^2 > 0.8$].

The selected markers present a minimum allele frequency of 0.05 in the CEU population, composed of the descendants of northern and western Europe, consistent with the European descent of the population, according to the Brazilian demographic sense (2010), 70% of the population were caucasian.

The purified patient DNA was amplified by the Real-Time Polymerase Chain Reaction Technique (PCR) [Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA)]. Genotyping using TaqMan™ Genotyping Master Mix technology (Applied Biosystems) was performed to identify polymorphisms.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed in the SPSS program, version 20.0. Odds ratio (OR) and confidence interval (95% CI) were determined when possible. The Haploview 4.1 program was used to evaluate Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium.

Nominal variables were presented as frequency and percentage. Pearson's chi-square test or Fisher's exact test were used to assess differences between groups between categorical variables. The following genetic models of association between the markers (*tag*SNPs) were evaluated: dominant and recessive models, by the Pearson chi-square test or Fisher's exact test, and the additive model, by the binary logistic regression test.

RESULTS

Clinical and sociodemographic variables

The success rate of MI treatment was 87.5%. The variables age, gender, smoking habits, hygiene habits, decayed, missing and filled teeth index (CPOD) and periodontal community need for treatment (CPITN) can be found in Table 1. Clinical parameters: position, diameter, length, strap type and anchorage type are described in Table 2. Both tables were taken from the work of Reichow, et al. 2016. (28)

Table 1. Results of the univariate analysis, considering the clinical and sociodemographic variables for the case and control groups.

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

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. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2016;45:649-657.

Table 2. Results of the univariate analysis, considering as technical variable 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	0.025**	2.29 (1.14 - 4.49)
Maxilla	151	91.52	14	8.48		
Mandible	118	82.52	25	17.48		
Position of intallation	269	98.90	39	100.00	0.890*	
Vestibular	196	87.11	29	12.89		
Lingual	42	89.36	5	10.64		
Alveolar ridge	31	86.11	5	14.89		
Diâmeter (mm)[§]	272	100.00	39	100.00	0.802**	
1.3	36	85.71	6	14.29		
1.6/2.0	236	87.73	33	12.27		
Lenght (mm)[£]	272	100.00	39	100.00	0.948*	
5	9	90.00	1	10.0		
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	0.542*	
CB (low neck)	116	89.92	13	10.08		
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	0.474**	
Direct	177	88.50	23	11.50		
Indirect	43	84.31	8	15.69		
Type of moviment	233	85.66	35	89.74	0.109*	
Intrusion	123	90.44	13	9.56		
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. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2016;45:649-657.

Analysis of *tag*SNPs in the *RANKL* gene

The distribution of the genotypic frequencies for the polymorphisms studied in the control group were found in Hardy-Weinberg equilibrium. It can be seen that the SNPs rs931273 and rs12585229 are in high binding imbalance (Figure 1).

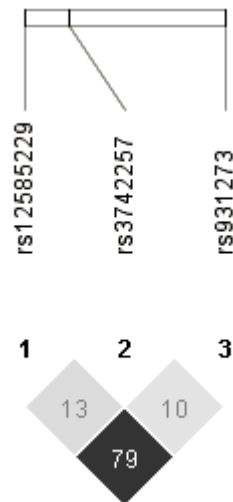


Figure 1. Map of linkage disequilibrium (DL) between *tag*SNPs of the *RANKL* gene. The numbers within the squares indicate the % in DL, and the color intensity reflects the degree of DL between two loci, the darkest being the largest DL among the SNPs.

The rs931273, rs372257, rs12585229 showed no association of protection or susceptibility to loss of MIs in both the recessive and dominant models (Table 3) and in the additive model (Table 4). The rs10388434 can't be evaluated, since it did not amplify, possibly by inappropriate design of the primers.

Table 3. Results of the univariate analysis of *RANKL* tagSNPs for the dominant and recessive models for the case and control groups (n = 135).

<i>TagSNPs db SNP ID^a</i>	<i>Alleles^{&}</i>	<i>Groups</i>	<i>Genotypes</i>	<i>Genotypes</i>	<i>p- value</i>	<i>OR (95% CI)</i>
rs3742257 (Dom C) n= 133	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,391**	0,736 (0,253-2,146)
		Caso	81 (78,,6)	22 (21,4)		
			25 (83,3)	5 (16,7)	0,814	1,109 (0,467-2,638)
			CT+TT	CC		
rs3742257 (Rec C) n = 133	[C/T]	Controle	71 (68,9)	32 (31,1)	0,814	1,109 (0,467-2,638)
		Caso	20 (66,7)	10 (33,3)		
rs12585229 (Dom C) n=132	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,662**	1,089 (0,109-10,859)
		Caso	98 (97,0)	3 (3,0)		
			30 (96,8)	1 (3,2)	0,994	0,997 (0,397-2,501)
			CT+TT	CC		
rs12585229 (Rec C) n=132	[C/T]	Controle	26 (25,7)	75 (74,3)	0,994	0,997 (0,397-2,501)
		Caso	8 (25,8)	23 (74,2)		
rs931273 (Dom C) n= 133	[C/T]	Controle	CC + CT	TT	0,659**	1,100 (0,110-10,969)
		Caso	99 (97,1)	3 (2,9)		
			30 (96,8)	1(3,2)	0,554	1,314 (0,531-3,254)
			CT+TT	CC		
rs931273 (Rec C) n=133	[C/T]	Controle	32 (31,4)	70 (68,6)	0,554	1,314 (0,531-3,254)
		Caso	8 (25,8)	23 (74,2)		

^a SNP identifier based on the NCBI dbSNP

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

*Pearson chi-square test

**Fisher exar test

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

Table 4. Result of univariate analysis of *RANKL* tagSNPs for the additive model for the case and control groups (n = 135).

<i>TagSNPs</i> ^a	<i>Variação</i> ^{&} [1/2]	<i>Genótipos</i>	<i>Grupo</i> Controle	<i>Grupo</i> Caso	<i>p-valor</i> [*]	<i>OR (IC 95%)</i>
rs931273	[C/T]	CC	70 (68,6)	23 (74,2)	0,990	0,986 (0,098 - 9,947)
		CT	29 (28,4)	7 (22,6)	0,793	0,724 (0,065-8,054)
		TT	3 (2,9)	1 (3,2)	0,814	
rs3742257	[C/T]	CC	32 (31,1)	10 (33,3)	0,604	1,375 (0,413-4,579)
		CT	49 (47,6)	15 (50,0)	0,606	1,347 (0,435-4,171)
		TT	22 (21,4)	5 (16,7)	0,854	
rs12585229	[C/T]	CC	75 (74,3)	23 (74,2)	0,944	0,920 (0,091-9,277)
		CT	23 (22,8)	7 (22,6)	0,941	0,913 (0,82-10,228)
		TT	3 (3,0)	1 (3,2)	0,997	

^a SNP identifier based on the NCBI dbSNP

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

^{*}Binary logistic regression

OR: Odds Ratio

CI: Confidence Interval

DISCUSSION

The possible early loss of a mini-implant during orthodontic treatment can affect planning and prolong treatment time.(17,37) Thus, many studies about the identification of factors related to the success of the technique have been reported. The success rate of the Reichow study was 87.5%, which is very close to that found by other authors.(29-32)

For the variable age, statistically significant values were not found when 227 orthodontic MIs were studied.(27) However, Lee et al. suggest that patients under the age of 20 years are in a high-risk group for MI loss(23), in agreement with Motoyoshi et al., who demonstrate higher success rates in adults than in adolescents.(1) On the other hand side, genetic factors described in animal model, showed a marked expression of RANKL and bone loss as the age advanced,(76) which may compromise the stability of the device. High success rate was observed in the study by Reichow et al.(28), the same sample of the present study, in which the age range ranged from 20 to 76 years.

It is known that the success of orthodontic MIs used for anchorage is conditioned by multifactorial causes, including genetic causes.(12-26,68) Current research has studied the association of polymorphisms in the *RANKL* gene with loss of orthodontic MIs.

Polymorphisms in the *RANKL* gene may influence protein expression levels, enhancing the process of osteoclastogenesis.(77) In addition, many factors are at the cellular and molecular level that contribute to the bone resorption process. (41) intronic regions corresponding to areas of DNA that are involved only in the transcription process, not being translated into proteins. However, rs2148073 of the *RANKL* gene was studied in relation to the compression ratio of the femoral neck, a new phenotypic parameter to detect bone density and potential for hip fracture. Polymorphism was significantly associated.(78)

Cheng et al. detected high linkage imbalance between rs3742257 and rs922996 ($d' = 0.92$, $r^2 = 0.94$), opting for genotyping only the second polymorphism. Of the 457 Taiwanese women studied, it was possible to patients who did not present alleles G / rs2148072, C / rs2200287, G / rs922996 had a higher risk of low postmenopausal mineral density (OR=2.09, 95%, CI=1.21-3.64). The authors also

point out that these three SNPs are located in the intron region and thus would not affect protein coding.(79)

Spencer et al. studied the age of menarche and menopause, since they may be associated with cancer, cardiovascular diseases and atheropathies. In a sample of 1,860 African-American women, 161,098 SNPs were evaluated. The polymorphisms rs3826620 (*RANK*) and rs931273 (*RANKL*) were found to be in poor linkage disequilibrium, showing no significance for this sample.(64)

However, in the present study, high linkage disequilibrium between *tag*SNPs rs931273 and rs12585229 was detected. Thus, for future studies of bins in the Brazilian population, genotyping of only one of the two polymorphisms is suggested, reducing the time and investment for the development of the research, while at the same time achieving effective capture of the genetic information.

A study by Wang et al. evaluated the possible differences between 41 polymorphisms of the *TNFSF11*, *TNFRSF11A* and *TNFRSF11B* genes of the *RANK/RANKL/OPG* system in relation to osteopathies. The Mongolian population was compared with five other populations: Chinese Han (Beijing-China), Japanese (Tokyo-Japan), Northern and Western Europeans (CEU), Yoruba (Ibadan- using chi-square tests and haplotype analysis. It was possible to conclude that there are significant differences between polymorphisms of the *TNFSF11* genes (*RANKL*) in the CEU and Yoruba populations when compared to the Mongols, differently from the Chinese, Japanese and Chinese northwest populations.(40)

The *tag*SNPs in the *RANKL* gene, rs931273 and rs12585229 were not shown associated with the loss of orthodontic mini-implants, as well as in the study conducted in the Chinese population where bone mineral density was evaluated. (34)

Lu et al. found an association of three polymorphisms in the *RANKL* gene: rs2200287 ($p=0.005$), rs9525641 ($p=0.039$), and rs1054016 ($p=0.047$) in relation to the age of menarche when analyzing 19 SNFRs11 SNPs in a random sample of 306 women(80) It is known that the amount of hormones during menarche changes drastically, and that hormones exert important roles in the expression of the *TNFRSF11A* and *TNFSF11* gene.(81) Thus, the authors suggest that, in periods when there are significant changes in the amount of hormones, they could also directly result in the activity of the genes.(80)

Mechanisms for the inhibition of the cytokine RANKL are described in the literature, because the reduction of this cytokine would decrease the development of skeletal tumors and breast cancer.(53,56) In another study, the decrease in RANKL and increase in OPG would result in less reabsorption bone in the treatment of malignancies and postmenopausal occurrences.(55)

This work is the first to investigate the association of polymorphisms in the *RANKL* gene with the loss of orthodontic mini-implants. Although the findings of this study do not demonstrate a genetic association with the loss of MIs, the *RANKL* gene is a potential candidate for the development of conditions related to bone metabolism, since other studies have been associated with peri-implantitis(82) osteoporosis(77), arteriopathy, periodontal disease,(34) bone metastasis and breast cancer.(54)

The hypothesis that loss of MIs is a result of multifactorial causes and that genetic polymorphisms represent one of the associated risk factors was suggested by the study of Reichow et al. 2016, which investigated the association of polymorphisms in the IL6 gene with the loss of intraosseous devices.(28) However, there is still little research that investigates the association of genetic factors with the loss of orthodontic MIs. Moreover, it is important to replicate these studies in other populations with a larger number of participants.

CONCLUSION

It can be concluded that:

- 1) None of the *tag*SNPs studied (rs3742257, rs931273 and rs12585229) were associated with the loss of orthodontic MIs.
- 2) In the studied population, the rs931273 and rs12585229 were in high linkage disequilibrium, and only one of them could be used in the study of bins in the Brazilian population

REFERECES

1. Motoyoshi M. Clinical indices for orthodontic mini-implants. *Journal of oral science*. 2011;53(4):407-12.
2. Turley PK, Kean C, Schur J, Stefanac J, Gray J, Hennes J, et al. Orthodontic force application to titanium endosseous implants. *The Angle orthodontist*. 1988;58(2):151-62.
3. Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *American journal of orthodontics*. 1984;86(2):95-111.
4. Costello BJ, Ruiz RL, Petrone J, Sohn J. Temporary skeletal anchorage devices for orthodontics. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2010;22(1):91-105.
5. Sugawara J. Temporary skeletal anchorage devices: the case for miniplates. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2014;145(5):559-65.
6. Antoszewska-Smith J, Sarul M, Lyczek J, Konopka T, Kawala B. Effectiveness of orthodontic miniscrew implants in anchorage reinforcement during en-masse retraction: A systematic review and meta-analysis. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2017;151(3):440-55.
7. Reynders RM, Ladu L. Mini-implants for orthodontic anchorage. *Evidence Based Dentistry*. 2017;18:82.
8. Alves M, Jr., Baratieri C, Mattos CT, Araujo MT, Maia LC. Root repair after contact with mini-implants: systematic review of the literature. *European journal of orthodontics*. 2013;35(4):491-9.
9. Feldmann I, Bondemark L. Anchorage capacity of osseointegrated and conventional anchorage systems: a randomized controlled trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2008;133(3):339.e19-28.
10. Sandler J, Murray A, Thiruvengatachari B, Gutierrez R, Speight P, O'Brien K. Effectiveness of 3 methods of anchorage reinforcement for maximum anchorage in adolescents: A 3-arm multicenter randomized clinical trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2014;146(1):10-20.
11. Nosouhian S, Rismanchian M, Sabzian R, Shadmehr E, Badrian H, Davoudi A. A Mini-review on the Effect of Mini-implants on Contemporary Orthodontic Science. *Journal of international oral health : JIOH*. 2015;7(Suppl 1):83-7.
12. Kanomi R. Mini-implant for orthodontic anchorage. *Journal of clinical orthodontics : JCO*. 1997;31(11):763-7.
13. Antoszewska J, Papadopoulos MA, Park HS, Ludwig B. Five-year experience with orthodontic miniscrew implants: a retrospective investigation of factors influencing success rates. *American journal of orthodontics and dentofacial*

orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2009;136(2):158.e1-10; discussion -9.

14. Yao CC, Chang HH, Chang JZ, Lai HH, Lu SC, Chen YJ. Revisiting the stability of mini-implants used for orthodontic anchorage. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi. 2015;114(11):1122-8.

15. Marquezan M, Mattos CT, Sant'Anna EF, de Souza MM, Maia LC. Does cortical thickness influence the primary stability of miniscrews?: A systematic review and meta-analysis. The Angle orthodontist. 2014;84(6):1093-103.

16. Chen Y, Kyung HM, Zhao WT, Yu WJ. Critical factors for the success of orthodontic mini-implants: a systematic review. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2009;135(3):284-91.

17. Jeong JW, Kim JW, Lee NK, Kim YK, Lee JH, Kim TW. Analysis of time to failure of orthodontic mini-implants after insertion or loading. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2015;41(5):240-5.

18. Sarul M, Minch L, Park HS, Antoszewska-Smith J. Effect of the length of orthodontic mini-screw implants on their long-term stability: a prospective study. The Angle orthodontist. 2015;85(1):33-8.

19. Shah AH, Behrents RG, Kim KB, Kyung HM, Buschang PH. Effects of screw and host factors on insertion torque and pullout strength. The Angle orthodontist. 2012;82(4):603-10.

20. Yoo SH, Park YC, Hwang CJ, Kim JY, Choi EH, Cha JY. A comparison of tapered and cylindrical miniscrew stability. European journal of orthodontics. 2014;36(5):557-62.

21. Wilmes B, Drescher D. Impact of bone quality, implant type, and implantation site preparation on insertion torques of mini-implants used for orthodontic anchorage. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2011;40(7):697-703.

22. Kakali L, Alharbi M, Pandis N, Gkantidis N, Kloukos D. Success of palatal implants or mini-screws placed median or paramedian for the reinforcement of anchorage during orthodontic treatment: a systematic review. European journal of orthodontics. 2018.

23. Lee SJ, Ahn SJ, Lee JW, Kim SH, Kim TW. Survival analysis of orthodontic mini-implants. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2010;137(2):194-9.

24. Moon CH, Park HK, Nam JS, Im JS, Baek SH. Relationship between vertical skeletal pattern and success rate of orthodontic mini-implants. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2010;138(1):51-7.

25. Ferreira NO, Andruccioli MC, Nelson-Filho P, Zanella EP, Consolaro A, Romano FL, et al. Bacterial biofilm on successful and failed orthodontic mini-implants--a scanning electron microscopy study. Microscopy research and technique. 2015;78(12):1112-6.

26. Mundt T, Schwahn C, Biffar R, Heinemann F. Changes in Bone Levels Around Mini-Implants in Edentulous Arches. The International journal of oral & maxillofacial implants. 2015;30(5):1149-55.

27. Park HS, Jeong SH, Kwon OW. Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2006;130(1):18-25.
28. Reichow AM, Melo AC, de Souza CM, Castilhos BB, Olandoski M, Alvim-Pereira CC, et al. Outcome of orthodontic mini-implant loss in relation to interleukin 6 polymorphisms. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2016;45(5):649-57.
29. Dalessandri D, Salgarello S, Dalessandri M, Lazzaroni E, Piancino M, Paganelli C, et al. Determinants for success rates of temporary anchorage devices in orthodontics: a meta-analysis (n > 50). *European journal of orthodontics.* 2014;36(3):303-13.
30. Melo AC, Andrichetto AR, Hirt SD, Bongiolo AL, Silva SU, Silva MA. Risk factors associated with the failure of miniscrews - A ten-year cross sectional study. *Brazilian oral research.* 2016;30(1):e124.
31. Rodriguez JC, Suarez F, Chan HL, Padial-Molina M, Wang HL. Implants for orthodontic anchorage: success rates and reasons of failures. *Implant dentistry.* 2014;23(2):155-61.
32. Reynders R, Ronchi L, Bipat S. Mini-implants in orthodontics: a systematic review of the literature. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2009;135(5):564.e1-19; discussion -5.
33. Shin YS, Ahn HW, Park YG, Kim SH, Chung KR, Cho IS, et al. Effects of predrilling on the osseointegration potential of mini-implants. *The Angle orthodontist.* 2012;82(6):1008-13.
34. Huja SS. Bone anchors--can you hitch up your wagon? *Orthodontics & craniofacial research.* 2015;18 Suppl 1:109-16.
35. 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. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2003;124(4):373-8.
36. Lim HJ, Eun CS, Cho JH, Lee KH, Hwang HS. Factors associated with initial stability of miniscrews for orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2009;136(2):236-42.
37. Lee JH, Choo H, Kim SH, Chung KR, Giannuzzi LA, Ngan P. Replacing a failed mini-implant with a miniplate to prevent interruption during orthodontic treatment. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics.* 2011;139(6):849-57.
38. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(33):25103-8.
39. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
40. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, NY).* 2000;289(5484):1504-8.

41. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy reports*. 2014;3:481.
42. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annual review of genomics and human genetics*. 2008;9:183-96.
43. Malkoc S, Ozturk F, Corekci B, Bozkurt BS, Hakki SS. Real-time cell analysis of the cytotoxicity of orthodontic mini-implants on human gingival fibroblasts and mouse osteoblasts. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2012;141(4):419-26.
44. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical biochemistry*. 2012;45(12):863-73.
45. Tsourdi E, Rijntjes E, Kohrle J, Hofbauer LC, Rauner M. Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1. *Endocrinology*. 2015;156(10):3517-27.
46. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell*. 2002;2(4):389-406.
47. Medina-Gomez C, Kemp JP, Trajanoska K, Luan J, Chesi A, Ahluwalia TS, et al. Life-Course Genome-wide Association Study Meta-analysis of Total Body BMD and Assessment of Age-Specific Effects. *American journal of human genetics*. 2018;102(1):88-102.
48. Wang J, Wang Y, Zhao Y, Li Y, Sun M, Na R, et al. Polymorphisms of genes in the OPG/RANKL/RANK pathway in the Mongols of Inner Mongolia China: relationship to other populations. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(2):3851-9.
49. Balzarini J. Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(8):583-97.
50. Maruyama K, Sano G, Matsuo K. Murine osteoblasts respond to LPS and IFN-gamma similarly to macrophages. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2006;24(6):454-60.
51. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Cytokines and pain. *Revista brasileira de anestesiologia*. 2011;61(2):255-9, 60-5, 137-42.
52. Arikan F, Buduneli N, Lappin DF. C-telopeptide pyridinoline crosslinks of type I collagen, soluble RANKL, and osteoprotegerin levels in crevicular fluid of dental implants with peri-implantitis: a case-control study. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2011;26(2):282-9.
53. de Groot AF, Appelman-Dijkstra NM, van der Burg SH, Kroep JR. The anti-tumor effect of RANKL inhibition in malignant solid tumors - A systematic review. *Cancer treatment reviews*. 2018;62:18-28.
54. Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology*. 2015;61(6):534-42.
55. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(1):147-54.
56. Schieferdecker A, Voigt M, Riecken K, Braig F, Schinke T, Loges S, et al. Denosumab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL. *Oncotarget*. 2014;5(16):6647-53.

57. Bruhn-Olszewska B K-BA, Węgrzyn G, Jakóbkiewicz-Banecka J. Prevalence of polymorphisms in OPG, RANKL and RANK as potential markers for Charcot arthropathy development Scientific Reports | 7: 501 | DOI:10.1038/s41598-017-00563-4. <s41598-017-00563-4.pdf>.
58. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000;408(6812):600-5.
59. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nature genetics*. 2009;41(1):15-7.
60. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.
61. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 1996;380(6570):152-4.
62. Farhat SB, de Souza CM, Braosi AP, Kim SH, Tramontina VA, Papalexiou V, et al. Complete physical mapping of IL6 reveals a new marker associated with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2017;52(2):255-61.
63. Sophocleous A, Idris AI, Ralston SH. Genetic background modifies the effects of type 2 cannabinoid receptor deficiency on bone mass and bone turnover. *Calcified tissue international*. 2014;94(3):259-68.
64. Spencer KL, Malinowski J, Carty CL, Franceschini N, Fernández-Rhodes L, Young A, et al. Genetic variation and reproductive timing: African American women from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) Study. *PloS one*. 2013;8(2):e55258.
65. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *The Lancet Infectious diseases*. 2004;4(12):739-49.
66. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annual review of immunology*. 2002;20:581-620.
67. Ban HJ, Heo JY, Oh KS, Park KJ. Identification of type 2 diabetes-associated combination of SNPs using support vector machine. *BMC genetics*. 2010;11:26.
68. Rakic M, Struillou X, Petkovic-Curcin A, Matic S, Canullo L, Sanz M, et al. Estimation of bone loss biomarkers as a diagnostic tool for peri-implantitis. *Journal of periodontology*. 2014;85(11):1566-74.
69. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Archives of oral biology*. 2013;58(5):530-6.
70. Mogi M, Otogoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Archives of oral biology*. 2007;52(9):894-8.
71. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant dentistry*. 2014;23(6):723-31.
72. Montes CC, Alvim-Pereira F, de Castilhos BB, Sakurai ML, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clinical oral implants research*. 2009;20(2):208-17.

73. Ribeiro R, Melo R, Tortamano Neto P, Vajgel A, Souza PR, Cimoies R. Polymorphisms of Il-10 (-1082) and RANKL (-438) Genes and the Failure of Dental Implants. *International journal of dentistry*. 2017;2017:3901368.
74. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology*. 2000;18(1):6-9.
75. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
76. Cao J, Venton L, Sakata T, Halloran BP. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(2):270-7.
77. Sassi R, Sahli H, Cheour E, Sellami S, El Gaaied ABA. -643C > T RANKL gene polymorphism is associated with osteoporosis in Tunisian postmenopausal women. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2017;20(4):374-8.
78. Dong S-S, Liu X-G, Chen Y, Guo Y, Wang L, Zhao J, et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcified tissue international*. 2009;85(2):104-12.
79. Cheng B-H, Wang T-H, Kang H-Y, Lin Y-C, Huang C-C, Hsu T-Y, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of the estrogen receptor 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand genes and bone mineral density in postmenopausal Taiwanese. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2013;52(2):197-203.
80. Lu Y, Liu P, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V. TNFRSF11A and TNFSF11 are associated with age at menarche and natural menopause in white women. *Menopause (New York, NY)*. 2010;17(5):1048-54.
81. Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *European journal of endocrinology*. 2001;145(2):199-205.
82. Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Archives of oral biology*. 2013;58(5):530-6.

ANEXOS

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celcius
μl	Microlitro
DATs	Dispositivos de ancoragem temporária
MI	Mini-implantes
MI	Mini-implante
et al.	E colaboradores
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa beta
RANKL	Receptor ativador ligante do fator nuclear kappa beta
OPG	Osteoprotegerina
<i>OPG</i>	Gene que codifica a proteína OPG
TNFRSF11B	Família do receptor do fator de necrose tumoral 11B
SNPs	Polimorfismos de base única
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>IL-6</i>	Gene que codifica a proteína IL-6
<i>tagSNPS</i>	SNPs representativos de um gene
<i>bins</i>	Blocos de desequilíbrio de ligação
DL	Desequilíbrio de Ligação
rpm	Rotações por minuto
mM	Milimolar
M	Molar
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
HCL	Ácido clorídrico

Tris	Hidroximetil aminometano
PH	Potencial hidrogeniônico
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
M	Molar
FAM	Frequência alélica mínima
CEU	Residentes de Utah com ascendência do Norte e da Europa Ocidental
rs	<i>reference</i> SNP
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
OR	<i>Oddis Ratio</i>
IC	Intervalo de Confiança
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
kb	Quilobase
dbSNP	Banco de dados de SNPs
bp	Pares de bases
CPOD	Índice de dentes cariados, perdidos e obturados índice
CPITN	Índice comunitário periodontal das necessidades de tratamento

Parecer de 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 Versão 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		

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO/DOCTORADO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **ANÁLISES CLÍNICAS E GENÉTICAS DE
SUSCETIBILIDADE À PERDA DE MINI IMPLANTES ORTODÔNTIDOS**

Pesquisadores: Laís Giacobbo / Maria Augusta Andrigo Perin / Bruno Castilhos /
Ana Cláudia Melo

Profª Drª Paula Cristina Trevilatto – Pesquisador Responsável

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

CEP: 80215-901 Prado Velho

Curitiba – PR

Telefone: 271-2108

Eu, _____
_____, entendo que estou sendo convidado(a) para participar de um projeto de pesquisa chamado **ANÁLISES CLÍNICAS E GENÉTICAS DE SUSCETIBILIDADE À PERDA DE MINI IMPLANTES ORTODÔNTICOS**, e que minha participação é VOLUNTÁRIA.

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

Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida, eu entendo que deverei fazer perguntas aos pesquisadores para que possa entender perfeitamente do que se trata.

Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por pesquisadores cirurgiões-dentistas, empenhados na pesquisa que analisará as possíveis causas das perdas de mini implantes usados no auxílio do tratamento ortodôntico, e que os resultados serão publicados sem a devida identificação dos participantes. Autorizo aos participantes do estudo a utilizar os meus registros de histórico médico atual e pregresso, a qualquer tempo durante a pesquisa, sabendo que estes não serão divulgados.

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

Eu entendo que os objetivos desta pesquisa são encontrar modificações genéticas e clínicas que sejam responsáveis por aumentar a susceptibilidade à perda de mini implantes ortodôntico, o que auxiliará no correto delineamento de um plano de tratamento ortodôntico aplicável e eficaz.

Eu entendo que não terei custos financeiros durante a pesquisa.

Eu, _____, natural
de _____, RG nº _____ CPF
nº _____, estado civil _____, morador à
rua _____, li e
compreendi todas as informações que foram passadas a mim sobre a minha participação
neste projeto de pesquisa. Também a mim foi dada a oportunidade de discutir e fazer

perguntas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Concordo voluntariamente com a minha participação neste estudo. Receberei uma cópia assinada deste formulário de consentimento informado. Minha concordância em participar deste estudo não retira nenhum dos meus direitos legais, no caso de negligência ou má prática de qualquer pessoa ou instituição que esteja envolvida neste estudo.

Data:

Testemunha:

Testemunha:

Após a autorização para a realização desta pesquisa junto ao Comitê de Ética, os pesquisadores abaixo nominados vêm, através deste termo, assumir o compromisso de que as identidades das pessoas entrevistadas serão mantidas em absoluto sigilo e anonimato. Além disso, garantem que todas as informações coletadas serão utilizadas, estritamente, para a realização do projeto de pesquisa e elaboração de artigos científicos, mantendo-se confidenciais.

Pesquisadores: _____

Laís Cristina Giaccobo

Maria Augusta Andrigo Perin

Ana Cláudia Melo

Paciente: _____

