



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – ORTODONTIA

BRUNO BORGES DE CASTILHOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE DO RANKL E A SUSCETIBILIDADE À
REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA**

CURITIBA

2013

BRUNO BORGES DE CASTILHOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE DO RANKL E A SUSCETIBILIDADE À
REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Área de concentração em Ortodontia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Co-Orientador: Prof. Dr. Cleber Machado de Souza

CURITIBA

2013

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

C352a
2013
Castilhos, Bruno Borges de
Análise de polimorfismos no gene do Rankl e a suscetibilidade à reabsorção
radicular apical externa / Bruno Borges de Castilhos ; orientadora: Paula
Cristina Trevilatto ; coorientador: Cleber Machado de Souza. – 2013.
37 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2013
Bibliografia: f. 22-26

1. Ortodontia. 2. Reabsorção da raiz. 3. Movimentação dentária. I. Trevilatto,
Paula Cristina. II. Souza, Cleber Machado de. III. Pontifícia Universidade
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.643

a



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

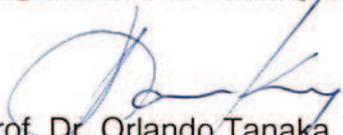
BRUNO BORGES DE CASTILHOS

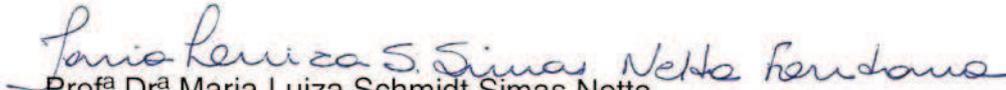
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE DO RANKL E A SUSCETIBILIDADE À REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA

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

Orientador(a):


Prof.ª Dr.ª Paula Cristina Trevilatto
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


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


Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Schmidt Simas Netta
Doutora em Ciências da Saúde, PUCPR

Curitiba, 03 de junho de 2013.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a minha família e amigos, que são os melhores Mestres da vida que acompanharam os meus primeiros passos e que sempre acreditaram em mim, que me estimulam, me fortalecem, me mostram os meus erros, me escutam com paciência e ajudam nos momentos mais delicados, proporcionando-me preciosos momentos na minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pelo acolhimento, pela concessão da bolsa de estudos e a oportunidade de estudar que me deu.

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

À Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto por ser um exemplo de profissional, com sua dedicada orientação, competência e cumplicidade, tempo e atenção dispensada durante todo o desenvolvimento desta dissertação e pela confiança no resultado final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cléber Machado de Souza, pelos ensinamentos transmitidos desde o início da pesquisa, pela amizade, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pelas oportunidades e proteção, de onde vem a força e fé que me faz caminhar para lutar e vencer todos os dias.

A minha família, pais e irmãos, pelo carinho e apoio incondicional, cada um à sua maneira, mas sempre presentes, apesar da distância.

A Renata Adriazola por todo o companheirismo, paciência e amor durante toda a caminhada e sua família por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Orlando Tanaka pelos ensinamentos, paciência, atenção e confiança prestada durante o curso. Com seus ensinamentos diretos, concretos e sua experiência profissional compartilhada.

À Profa. Dra. Elisa Camargo, exemplo de profissional e mãe, gentil e disposta a ajudar em qualquer momento com todo seu perfeccionismo.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pelos ensinamentos transmitidos desde o início do curso, pela amizade, paciência.

Ao Sérgio Takeo e Suellen Zaitter pela confiança e oportunidade que me deram ao poder trabalhar durante todo o curso.

Aos meus colegas de turma, por todo companheirismo, por compartilhar de todos os momentos bons e ruins nos fazendo crescer a cada dia.

À secretária de Pós-Graduação, em Odontologia Neide Reis Borges e a atendente Maria Nilce da Silva Reis pelo carinho, amizade e porque sempre nos ajudou prontamente.

A todas as pessoas que de diferentes maneiras direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	6
RESUMO	7
INTRODUÇÃO.....	8
OBJETIVO	111
MATERIAL E MÉTODOS	122
RESULTADOS	166
DISCUSSÃO.....	177
CONCLUSÃO	201
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	222
TABELAS.....	277
FIGURAS.....	29
ANEXO I - JUSTIFICATIVA PARA PASSAGEM DIRETA DO MESTRADO PARA O DOUTORADO.....	31
ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS	32

ARTIGO EM PORTUGUÊS

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE DO RANKL E A SUSCETIBILIDADE À REABSORÇÃO RADICULAR APICAL

BRUNO BORGES DE CASTILHOS, DDS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Ortodontia
Escola de Saúde e Biociências
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Email: brunocastilhos86@hotmail.com

Autor correspondente

Paula Cristina Trevilatto, DDS, PhD

Professor, Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Escola de Saúde e Biociências
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.
Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho,
CEP 80215-901 – Curitiba, PR
Email: paula.trevilatto@pucpr.br

1 RESUMO

2 **Introdução:** A identificação de fatores implicados na iniciação e progressão da
3 reabsorção radicular apical externa (RRAE) durante o tratamento ortodôntico tem sido o foco
4 de inúmeros estudos. Os recentes avanços no conhecimento da biologia de células ósseas
5 demonstraram o papel fundamental do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANK),
6 do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANKL) e da Osteoprotegerina
7 (OPG) no sistema de diferenciação e função dos osteoclastos. Polimorfismos são variações
8 nos genes, que podem impactar na quantidade ou função da proteína expressa. *Single*
9 *nucleotide polymorphisms* (SNPs) são as mais frequentes variações nos genes humanos.
10 SNPs no gene do mediador (ou da citocina) RANKL (*RANKL*) têm sido relacionados com
11 condições fisiopatológicas, como: osteoporose, artrite reumatoide, perda de densidade
12 mineral óssea e periodontite agressiva. **Objetivo:** Investigar a associação de polimorfismos
13 do tipo tagSNPs (que capturam a informação de todos os SNPs de um gene por alto grau de
14 desequilíbrio de ligação no gene *RANKL* e variáveis clínicas, com a RRAE em pacientes
15 tratados e não tratados ortodonticamente. **Método:** A amostra foi composta de 372
16 pacientes não aparentados, de ambos os sexos, com média de idade de 14,9 anos (8 a 21
17 anos), com maloclusão de Classe II divisão 1, sendo 334 pacientes tratados
18 ortodonticamente, por meio das técnicas de *Edgewise* ou *Straight Wire* e 38 pacientes não
19 tratados. Radiografias periapicais dos incisivos centrais com as raízes mais longas (dentes
20 de referência) foram tomadas no pré-tratamento e seis meses após o início do tratamento.
21 As células foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose a 3% durante 1
22 minuto e raspagem da mucosa bucal com uma espátula esterilizada. O DNA foi extraído a
23 partir de células epiteliais bucais com acetato de amônio a 10 M e EDTA a 1 mM. A análise
24 dos polimorfismos do gene do RANKL foi realizada pela técnica de PCR em tempo real.
25 Análises univariadas e multivariadas foram realizadas para verificar a associação de
26 variáveis clínicas e genéticas com a RRAE ($p < 0,05$). **Resultados:** Observou-se maior
27 proporção de RRAE em pacientes tratados ortodonticamente. O maior comprimento inicial
28 da raiz e a extração de pré-molares mostraram-se associados à RRAE na uni e multivariada.
29 Considerando o estudo de polimorfismos do gene *RANKL*, nenhuma associação
30 estatisticamente significativa foi encontrada dos polimorfismos genéticos com a RRAE.
31 **Conclusão:** Aspectos clínicos, como comprimento inicial da raiz e extração de pré-molares,
32 foram associados com a RRAE. No entanto, os fatores genéticos estudados não mostraram-
33 se associados com essa condição complexa.

34 **Palavras-chaves:** RANKL, movimentação dentária, reabsorção radicular apical
35 externa

1 INTRODUÇÃO

2

3 Pela primeira vez em 1927, Ketchan et al relataram sobre a reabsorção
4 radicular apical externa (RRAE).^{1,2} Hoje em dia, já se sabe que a RRAE situa-se
5 entre os mais comuns e indesejáveis efeitos colaterais do tratamento ortodôntico.³⁻¹⁰
6 Muitos estudos têm como objetivo descobrir os diversos fatores relacionados à
7 movimentação ortodôntica e à RRAE, mas até agora essa questão está pouco
8 resolvida e não é possível prever quem irá desenvolvê-la.^{8,11} A frequência da RRAE
9 severa durante o tratamento ortodôntico é relatada em 5% a 18% dos casos.^{12,13}

10 Alguns pesquisadores relatam que a aplicação de forças ortodônticas induz a
11 um processo local, que possui todas as características da inflamação.^{9,10} Esta
12 inflamação é essencial para a movimentação dentária, sendo também o principal
13 componente responsável pelo processo de reabsorção radicular.^{9,14} A identificação
14 de fatores implicados na iniciação e progressão da RRAE durante o tratamento
15 ortodôntico tem sido o foco de inúmeros estudos. Estes fatores incluem: gênero do
16 paciente¹⁵, forma radicular¹⁶, dentes traumatizados previamente ao tratamento
17 ortodôntico¹⁷, dentes tratados endodonticamente¹⁸, idade do paciente, o estágio de
18 formação radicular no início do tratamento ortodôntico¹⁵, o tipo do aparelho
19 utilizado¹⁹, as forças aplicadas²⁰, a duração do tratamento¹⁶ e o *background*
20 genético.^{5,8,11,21,22}

21 A grande dificuldade de se avaliar as causas da RRAE é separar as
22 contribuições referentes à genética dos fatores ambientais.²¹ Newman et al, em
23 1975,²³ foram os primeiros a relatar uma base genética para a RRAE, mas ainda era
24 pouco esclarecida. Já Harris et al⁸, em 1997, estimaram o peso relativo do fator
25 hereditariedade através de modelo genético utilizando pares de irmãos. A primeira
26 descrição de um marcador genético que identificava indivíduos mais propensos à
27 RRAE foi relatada por Al Qawasmi et al⁴. Nesse estudo, um polimorfismo no gene da
28 interleucina-1 β (*IL1B*⁺³⁹⁵⁴) foi associado à RRAE durante o tratamento ortodôntico.
29 Mas, ainda assim, não existem marcadores genéticos confiáveis para prever quais
30 pacientes poderão desenvolver RRAE após a movimentação ortodôntica.²⁴

31

32

1 Os recentes avanços no conhecimento da biologia de células ósseas
2 demonstram o papel fundamental do receptor ativador do fator nuclear kappa B
3 (RANK), do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e da
4 osteoprotegerina (OPG) no sistema de diferenciação e ativação dos osteoclastos.²⁵

5 O RANKL é uma citocina que pertence à família do TNF (fator de necrose
6 tumoral) e é essencial para a indução da osteoclastogênese. Osteoblastos e células
7 estromais da medula óssea produzem esta citocina, que se liga ao seu receptor
8 específico (RANK), localizado na superfície das células progenitoras de
9 osteoclastos. A OPG é uma citocina pertencente à família do TNF, produzida por
10 osteoblastos e células estromais da medula óssea. Esta citocina inibe a
11 osteoclastogênese por competir com o RANK pela ligação ao RANKL. Assim, RANK
12 e OPG regulam a reabsorção óssea por exercerem um efeito positivo ou negativo,
13 respectivamente, no controle da ligação do RANKL aos osteoclastos. O eixo RANK/
14 RANKL/OPG também está envolvido na destruição óssea inflamatória, induzida por
15 citocinas pró-inflamatórias, tais como prostaglandina E₂ (PGE₂), IL-1 β , IL-6 e TNF-
16 α .^{25,26}

17 No ser humano, a citocina RANKL é o produto de um gene que se encontra
18 no braço longo do cromossomo 13, na região 13q14.²⁷ O gene, composto por oito
19 exons e introns intermediários, possui uma extensão aproximadamente de 58
20 kilobases (kb).²⁸ Polimorfismos, que são alterações genéticas frequentes na
21 população, referem-se à existência de dois ou mais alelos em um determinado *locus*
22 com uma frequência maior do que 1% em uma população.²⁹ Polimorfismos no gene
23 do RANKL têm sido relacionados com condições patológicas, como:
24 osteoporose^{30,31}, artrite reumatoide³², perda de densidade mineral óssea³³ e
25 periodontite agressiva.³⁴

26 Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são as formas mais comuns de
27 variação do DNA no genoma humano. Recentemente, vários estudos buscam uma
28 abordagem genética que se utiliza de SNPs em desequilíbrio de ligação (DL). Dessa
29 forma, não seria necessário genotipar todos os SNPs de um determinado gene, mas
30 SNPs “alvos” (tagSNP), que capturam toda a informação do gene em termos de
31 variabilidade. Essa estratégia destina-se a capturar o máximo de informação sobre a
32 variabilidade de um gene, com a investigação de menos SNPs, reduzindo custos e
33 tempo de genotipagem.³⁵

- 1 Até o presente momento, nenhum estudo investigou polimorfismos no gene
- 2 do RANKL e sua associação com a RRAE.
- 3

1 OBJETIVO GERAL

2

3 O objetivo deste estudo foi investigar a associação das variáveis clínicas e
4 polimorfismos no gene do RANKL (*RANKL*) com a reabsorção radicular apical
5 externa.

6

7

8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10 O objetivo deste estudo foi investigar a associação das:

11

12 • Investigar as variáveis clínicas: sexo, idade, comprimento inicial da raiz do
13 incisivo central, extração de pré-molar, uso de aparelho pêndulo, expansão
14 rápida da maxila, uso de elásticos e uso de aparelho extrabucal, e sua
15 associação com a reabsorção radicular apical externa.

16

17 • Analisar a associação de polimorfismos (tagSNPs) no gene *RANKL* com a
18 reabsorção radicular apical externa.

19

20 • Definir os *bins* (blocos gênicos em alto desequilíbrio de ligação) do gene
21 *RANKL* na amostra de pacientes do sul do Brasil.

22

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 ***População de estudo***

4 A amostra deste estudo está composta de 372 pacientes caucasoides não
5 relacionados, de ambos os sexos, idade média de 14,9 anos (8 a 21 anos), com
6 maloclusão de Classe II 1ª divisão, dos quais 334 pacientes foram tratados
7 ortodonticamente, por meio das técnicas *Edgewise* ou *Straight-Wire*, e 38 não foram
8 tratados. A escolha da maloclusão Classe II, 1ª divisão foi devida a este tipo de
9 maloclusão ser uma das mais frequentes e que exige maior tempo de tratamento,³⁶
10 além do fato de que pode levar a níveis mais elevados de RRAE.^{37,38} Os pacientes
11 foram selecionados dos prontuários das Clínicas Odontológicas do Curso de Pós-
12 Graduação em Ortodontia (Bauru-SP), do Curso de Pós-Graduação em Ortodontia
13 do Instituto Thum de Investigação (Joinville-SC) e de duas clínicas privadas de
14 Ortodontia (Curitiba-PR). Embora a amostra do estudo seja composta por
15 caucasoides, a população brasileira branca é heterogênea. Artigos recentes não têm
16 recomendado agrupar brasileiros com base na etnia, cor e origem geográfica,
17 porque os indivíduos brasileiros classificados como brancos ou negros apresentam
18 sobreposição de genótipos, devido à miscigenação.³⁹

19 Os pacientes preencheram questionários com histórico pessoal, médico e
20 odontológico, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, após
21 serem avisados da natureza do estudo (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
22 da PUCPR, protocolo n° 546/05). Os pacientes não poderiam ter uso crônico de anti-
23 inflamatórios, infecção por HIV, história de quimioterapia imunossupressora,
24 qualquer doença que comprometesse gravemente a função imunológica, gravidez
25 ou lactação, trauma oral, comportamento parafuncional observável, tratamento
26 endodôntico e extensas lesões de cárie nos incisivos centrais superiores.

27 Radiografias periapicais dos incisivos centrais com as raízes mais longas (de
28 referência) foram tomadas no pré-tratamento e seis meses após o início do
29 tratamento. O método de avaliação consistiu em medir os comprimentos de raiz e
30 coroa diretamente nas radiografias (Fig. 1a, b). O ápice da raiz, a borda incisal e a
31 junção amelocementária (JAC) de cada dente foram demarcados nas películas de
32 raios-x sobre um negatoscópio. O eixo longitudinal de cada dente foi construído a
33 partir do ápice do meio da borda incisal, seguindo o canal com a maior precisão

1 possível. Um eixo perpendicular foi então projetado ao eixo longitudinal do lado
2 mesial ao distal da JAC. O comprimento da coroa foi medido a partir da borda incisal
3 até a JAC, e o comprimento da raiz, da JAC até o ápice radicular (Fig. 1a, b). A
4 diferença resultante entre as medidas de pré-tratamento e seis meses após o início
5 do tratamento pode indicar a presença de RRAE. Um fator de correção (FC) foi
6 calculado: $FC = C1/C2$ (C1 é o comprimento da coroa no pré-tratamento, C2 é o
7 comprimento da coroa 6 meses após o início do tratamento). Então, a RRAE foi
8 calculada utilizando a seguinte fórmula: $R1 - RRAE = (R2 \times FC)$; R1 é o comprimento
9 da raiz no pré-tratamento e R2 é o comprimento da raiz de 6 meses após o início do
10 tratamento. RRAE também foi expressa como uma porcentagem do comprimento da
11 raiz original: $RRAE \times 100/R1$. Dentes apenas com completa formação radicular
12 foram considerados para a investigação. Qualquer distorção entre o pré-tratamento
13 e a imagem radiográfica de acompanhamento foi corrigido utilizando o registro do
14 comprimento da coroa, assumindo que o comprimento da coroa foi imutável durante
15 o período de observação.^{40,41} A RRAE foi avaliada por um único examinador
16 (MLSSNF). As radiografias foram examinadas sobre um negatoscópio e as
17 medições foram feitas com a ponta do paquímetro digital com precisão de até 0,02
18 mm (UTUSTOOLS Professional, Paquímetro Digital Eletrônico) (Fig. 2).

19 O valor de 1,43 mm foi estabelecido para definir a presença de RRAE em
20 indivíduos tratados ortodonticamente, por meio da construção de uma curva que
21 analisou a distribuição dos valores de RRAE da própria amostra (a partir da
22 construção de uma curva ROC), e foi fixado como o valor de corte. Dessa forma, a
23 amostra foi dividida em dois grupos:

24

25 **Grupo 1:** 196 indivíduos sem RRAE com $RRAE \leq 1,43$ milímetros, sendo 158
26 tratados ortodonticamente e 38 indivíduos não tratados ortodonticamente;

27 **Grupo 2:** 176 indivíduos tratados ortodonticamente com $RRAE > 1,43$ milímetros.

28

29 **Parâmetros clínicos**

30 Os seguintes parâmetros foram avaliados: sexo, idade, comprimento inicial da
31 raiz do dente de referência (RI), extração de pré-molar (EP), uso de aparelho
32 pêndulo, expansão rápida da maxila (ERM), uso de elásticos (EX) e uso de aparelho
33 extrabucal (AEB).

1 **Coleta e purificação do DNA**

2 As células foram obtidas por meio de um bochecho com solução de glicose a 3%
3 durante 1 minuto e raspagem da mucosa bucal com uma espátula esterilizada.⁴² O
4 DNA foi extraído a partir de células epiteliais bucais com acetato de amônio a 10 M e
5 EDTA a 1 mM.⁴³

7 **Análise de polimorfismos no gene RANKL**

8 Os tagSNPs do gene *RANKL* foram selecionados, de acordo com a informação
9 disponível no site *International HapMap Project, phase III/Rel#2*
10 (<http://www.hapmap.org>, 2012) (Fig. 3). Todos os marcadores selecionados
11 apresentaram uma frequência alélica mínima (FAM) de 0,05 na população CEU
12 (residentes de Utah com ascendência europeia do norte e oeste). O parâmetro de
13 corte para definir DL entre dois marcadores foi $r^2 > 0,8$. Seguindo estes critérios, os
14 seguintes tagSNPs foram incluídos: rs1038434, rs3742257, rs931273, rs12585229
15 (Fig 3). Os pacientes foram genotipados para os tagSNPs por meio da técnica de
16 PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System), com o uso
17 da tecnologia TaqMan™ (Applied Biosystems).⁴⁴

18

19 **Análise estatística**

20 Variáveis nominais foram expressas por frequências e porcentagens e as não-
21 nominais, por média e desvio padrão. As comparações entre os grupos em relação
22 às variáveis quantitativas utilizaram a análise de variância (ANOVA) com um fator e
23 teste de diferença mínima significativa (LSD) para comparações múltiplas. Ajustes
24 da curva de características de operação do receptor (ROC) foram feitas para RRAE,
25 idade e comprimento inicial radicular, com o objetivo de determinar pontos de corte
26 associados à RRAE. O teste t não emparelhado foi utilizado para comparar média de
27 idade e o comprimento da raiz inicial entre os grupos com e sem RRAE. As
28 frequências genotípicas dos grupos foram comparadas por análise univariada
29 utilizando o teste do qui-quadrado ou de Pearson para o modelo dominante e
30 recessivo, e regressão logística para o modelo aditivo. Para a análise multivariada, o
31 modelo de regressão logística incluiu as variáveis que apresentaram valores
32 de $p < 0,20$ na análise univariada. Resultados com erro tipo 1 (alfa) inferior ao valor
33 de 0,05 (valor de p) foram considerados significativos. As análises foram realizadas

- 1 com o software estatístico SPSS 13.0. Utilizou-se o Haploview 4.2 para estimar o
- 2 equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os tagSNPs.
- 3

1 RESULTADOS

2

3 **Parâmetros clínicos**

4 Observou-se maior proporção de RRAE em pacientes tratados
5 ortodonticamente (RRAE \leq 1,43 mm: 0,81 mm; RRAE $>$ 1,43 mm: 2,24 mm), quando
6 comparados com indivíduos que nunca utilizaram aparelho ortodôntico (RRAE: 0,05
7 mm).

8 Não houve diferenças estatisticamente significativas observadas entre os
9 grupos em relação ao gênero, idade, tipo de aparelho utilizado, uso de aparelho de
10 pêndulo, ERM, AEB e EX. Uma diferença estatisticamente significativa foi
11 encontrada entre os grupos em relação à RI ($p=0,001$) e EP ($p=0,019$). Para a
12 análise multivariada, foram consideradas as variáveis com valor de $p<0,200$ (idade:
13 $p=0,144$, EP: $p=0,019$, RI: $p=0,001$, rs1038434 no modelo aditivo: $p=0,200$, e
14 rs1038434 no modelo recessivo para o alelo C: $p=0,182$). Após a análise
15 multivariada, as variáveis RI ($p=0,028$) e EP ($p=0,000$) mantiveram-se associadas
16 com RRAE (Tabela I). Ou seja, maiores valores de comprimento inicial de raiz e
17 extração de pré-molares estão associados com a RRAE.

18

19 **Análise de polimorfismos no gene RANKL**

20 A distribuição de genótipos do *RANKL* está em equilíbrio de Hardy-Weinberg,
21 o que mostra que a genotipagem está confiável e as frequências genotípicas
22 esperadas (estimadas pelo binômio de Newton) estão de acordo com as frequências
23 genotípicas observadas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi
24 encontrada na frequência genotípica dos polimorfismos do gene *RANKL* entre os
25 grupos (Tabela II), ou seja, não houve associação de nenhum polimorfismo com a
26 RRAE, nem no sentido de suscetibilidade (predisposição) nem no sentido de
27 proteção. O mapa de desequilíbrio de ligação para a população estudada pode ser
28 observado na figura 4.

29

1 DISCUSSÃO

2

3 Sabe-se que a RRAE é um efeito secundário indesejável no tratamento ortodôntico e
4 que, na maioria dos casos, ela ocorrerá de forma leve, não tendo significado
5 clínico.⁴⁵ No entanto, a RRAE apresenta um aspecto clinicamente importante
6 quando 1 a 2 mm ($\frac{1}{4}$) do comprimento da raiz são perdidos.⁴⁶ Casos graves são
7 considerados quando a reabsorção atinge mais que $\frac{1}{4}$ da raiz do dente ($> 5,0$ mm) e
8 ocorrem em apenas 1 a 5 % dos pacientes.⁴⁷

9 A etiologia da RRAE é complexa e vários fatores mecânicos e biológicos
10 podem contribuir para sua ocorrência.⁴⁸ Fatores isolados ou associados podem
11 contribuir para o desenvolvimento da RRAE, como idade do paciente, tipo do
12 aparelho ortodôntico, magnitude e duração da força, direção do movimento
13 dentário⁴⁹ e *background* genético.⁸

14 Neste estudo, o comprimento inicial da raiz do incisivo central superior (dente
15 referência) e a extração de pré-molar foram associados com RRAE. A associação do
16 comprimento inicial da raiz dental com a RRAE pode ser explicada pelo fato de o
17 dente com maior raiz provavelmente apresentar maior deslocamento tanto com
18 relação à movimentação apical quanto ao torque.⁵⁰ No entanto, a RRAE pode ser
19 mais preocupante em raízes mais curtas que em dentes com raízes médias ou
20 longas.⁵⁰⁻⁵² A associação entre extrações de pré-molares e RRAE em paciente
21 tratados ortodonticamente tem sido relatada em alguns estudos.^{3,38,41} Isto pode ser
22 explicado por serem os incisivos que sofrem maior força e movimentação na
23 retração ortodôntica de pacientes. No entanto, outros autores não encontraram essa
24 relação entre RRAE e tratamentos com extrações de pré-molares,^{7,53} talvez pelo fato
25 de o paciente estar mais propenso à RRAE, após as fases de alinhamento,
26 nivelamento e retração, durante as quais ocorrerá maior movimentação dos
27 incisivos. Por isso, o acompanhamento radiográfico do paciente por um período mais
28 longo torna-se altamente relevante.

29 Neste estudo não foram encontradas relações entre idade do paciente e
30 RRAE, no entanto, já foi relatada a relação entre maior RRAE e pacientes mais
31 velhos.^{19,53,54} De acordo com Lupi et al⁵⁵, fatores como um metabolismo ósseo
32 menos ativo e menor vascularização poderiam auxiliar a explicar essa relação.

1 Neste estudo, a faixa etária foi bastante homogênea, sendo a possível explicação
2 para a não associação da RRAE com a idade.

3 O uso de elásticos de Classe II não se mostrou diferente entre os grupos em
4 relação à RRAE. No entanto, alguns autores^{40,52} relatam que o uso de elásticos
5 Classe II consiste em um fator de risco, principalmente no dente de apoio.

6 Assim como Brezniak et al^{9,56} relataram, não houve diferença entre pacientes
7 quanto ao sexo, o que também já foi observado por outros autores^{51,53},
8 especialmente em estudos com amostras maiores. No entanto, encontram-se na
9 literatura autores evidenciando maior presença de RRAE tanto em homens^{18,54}
10 quanto nas mulheres^{23,57}, sendo ainda pouco conclusivo afirmar se e qual gênero
11 aumenta a predisposição à RRAE.

12 Os pacientes dessa amostra que utilizaram o aparelho de expansão rápida da
13 maxila tipo Hass também utilizaram o aparelho pêndulo, sendo que os incisivos não
14 apresentaram maior RRAE durante a expansão rápida da maxila e uso do aparelho
15 pêndulo. No entanto, Vardimon et al⁵⁸ encontraram maior RRAE em incisivos de
16 gatos após a expansão rápida da maxila. Infere-se, portanto, que não haja influência
17 entre as técnicas *Edgewise* e *Straight-Wire*, o que foi observado por outros
18 autores^{41,59,60}, no entanto outros autores^{19,61} observaram maior RRAE em pacientes
19 tratados com a técnica *Edgewise* do que com a técnica *Straight-Wire*. Esta diferença
20 pode ser explicada pela técnica *Straight-Wire* apresentar forças mais suaves e
21 constantes, mas acredita-se que isso dependa principalmente do ortodontista
22 responsável¹⁹.

23 O uso do raio-x tem sido a melhor maneira em custo e benefício para
24 diagnosticar a presença de RRAE⁴¹ e o método com radiografias periapicais é o
25 melhor para estudos clínicos de RRAE, por isso tem sido utilizado pela grande
26 maioria dos autores.^{1,8,15,17,23,40,61-63} Radiografias periapicais são muito superiores às
27 panorâmicas, oclusais e laterais para o estudo das raízes dentárias, pois com essa
28 técnica ocorre menor radiação ao paciente, menor distorção, menor sobreposição de
29 imagens⁶¹. No entanto, ela apresenta pontos negativos, como vista restrita,
30 dificuldade na padronização da técnica, além de ser um método estático que não
31 permite afirmar a dinâmica da reabsorção (se em curso ou encerrada).^{11,64}

32 É sugerido que pacientes suscetíveis à RRAE possam ser identificados já no
33 início do tratamento, através do raio-x periapical, realizado após os primeiros 6

1 meses de tratamento^{65,66}. A presença de RRAE já no início do tratamento (ou até
2 mesmo antes deste) pode ser um preditor de maior risco de reabsorção durante o
3 tratamento.^{67,68} Segundo Artun et al.⁶⁸, as chances de apresentar um incisivo com
4 mais de 5,0 mm de RRAE ao final do tratamento é três vezes maior quando aos 6
5 meses o paciente apresenta um incisivo com mais de 1,0 mm de RRAE e 15 vezes
6 maior quando apresenta 2,0 mm de RRAE. Caso a RRAE seja descoberta, o
7 cirurgião-dentista deve informar ao seu paciente e o tratamento ativo deve ser
8 interrompido durante 3-4 meses e, após isso, o acompanhamento radiográfico deve
9 ser realizado.⁶⁵

10 Os fatores genéticos que predisõem à RRAE também foram investigados
11 nos últimos tempos. A descoberta de marcadores genéticos pode ajudar a identificar
12 pacientes com maior risco à RRAE antes de iniciar o tratamento.⁶⁹ Nesse contexto,
13 Newman et al²³, em 1975, foram os primeiros a propor formalmente uma base
14 genética para a RRAE. Mais tarde, Al-Qawasmi et al⁴ (2003) evidenciaram a
15 associação de polimorfismos no gene da IL1- β com RRAE em um estudo
16 envolvendo 35 famílias. Ademais, uma região do cromossomo 18 (TNFRSF11A)
17 mostrou-se ligada com a RRAE⁵. Mais recentemente, outra pesquisa identificou uma
18 associação entre RRAE e alelos do gene da IL1- β ⁷⁰. Também, o genótipo TT de um
19 SNP no gene da IL-1 α associou-se à RRAE em uma população americana¹¹ e um
20 polimorfismo no gene do receptor da vitamina D (VDR) foi fracamente associado
21 com a RRAE em uma população brasileira.⁶³ No entanto, ainda são escassos os
22 estudos tentando definir marcadores de risco genético
23 (suscetibilidade/predisposição) à RRAE e estes ainda são pouco preditivos.

24 A descoberta do sistema RANKL / RANK / OPG, em meados de 1990, levou a
25 grandes avanços na compreensão da reabsorção óssea (metabolismo ósseo). Era
26 conhecido por muitos anos antes desta descoberta que células osteoblásticas do
27 estroma regulavam a formação de osteoclastos²⁵. RANKL / RANK regulam a
28 diferenciação e ativação de osteoclastos na remodelação óssea normal e a
29 reabsorção óssea sob uma variedade de condições patológicas, caracterizadas pelo
30 aumento da remodelação óssea. A OPG protege da excessiva reabsorção do osso a
31 partir da ligação com RANKL, assim impedindo-a de se ligar a RANK. Desse modo,
32 a concentração relativa de RANKL e OPG no osso se torna um fator
33 determinante.^{25,71,72} Estudos também revelaram novas funções dessa tríade em

1 outras patologias e tecidos, sugerindo que, em resposta a forças mecânicas,
2 osteócitos regulam o recrutamento de osteoclastos para a reabsorção óssea,
3 induzindo a expressão de RANKL por células osteoblásticas no micro-ambiente
4 local.⁷³⁻⁷⁵

5 RANKL é uma citocina reguladora na diferenciação e ativação de
6 osteoclastos, cuja expressão é regulada por diversos hormônios e citocinas,
7 culminando no seu efeito de reabsorção óssea.⁷⁶ A produção de RANKL por células
8 T ativadas pode regular diretamente a osteoclastogênese e a remodelação óssea.
9 Isso ajuda a explicar porque doenças auto-imunes, cânceros, leucemias, asma,
10 infecções virais crônicas e a doença periodontal podem provocar a perda óssea
11 sistêmica e/ou local. Em particular, a RANKL parece ser o princípio etopatogênico
12 que provoca a destruição da cartilagem e do osso na artrite.⁷⁷

13 Polimorfismos no gene do RANKL têm sido associados com a densidade
14 mineral óssea, remodelação óssea e doenças onde a perda óssea é um sinal
15 crucial.^{78,79} Até o momento, na odontologia, polimorfismos no gene da RANKL foram
16 somente associados com a doença periodontal⁷⁵. No entanto, em nosso
17 conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a associação de polimorfismos
18 em genes do sistema RANK / RANKL / OPG com a susceptibilidade à RRAE em
19 pacientes tratados e não tratados ortodonticamente. Observou-se que não houve
20 associação de polimorfismos no gene do RANKL com à RRAE, embora a literatura
21 apresente estudos que encontraram polimorfismos no gene do RANKL associados a
22 doenças ósseas.^{30,34,80,81}

23 Mais estudos são necessários, incluindo os genes das outras duas citocinas:
24 RANK e OPG, em amostras mais amplas, para a elucidação da participação de
25 variações nesses genes no complexo processo de RRAE.

26 Importante notar que, em estudos genéticos em pacientes com e sem RRAE,
27 esse estudo contempla, até o momento, a maior amostra da literatura.

28 Os polimorfismos rs931273 e rs12585229 estão em alto desequilíbrio de
29 ligação na população brasileira estudada, o que significa que, em futuros estudos
30 investigando o gene *RANKL* e sua associação com doenças e outras condições
31 fisiopatológicas, apenas um dos dois SNPs acima mencionados será necessário
32 para a investigação do gene completo.

33

1 CONCLUSÃO

2

3 Observou-se que o comprimento inicial da raiz do dente de referência e a extração
4 de pré-molares durante o tratamento ortodôntico foram associados com a RRAE na
5 população estudada. Entretanto, na análise de polimorfismos no gene *RANKL*, não
6 houve associação de qualquer SNP com a RRAE.

7

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

- 3 1. Ketcham AH. A preliminary report of an investigation of apical root resorption of
4 vital permanent teeth. *Int J Orthod* 1927;13:97-127.
- 5 2. Ketcham AH. A progress report of an investigation of apical root resorption of vital
6 permanent teeth. *Int J Orthod* 1929;15:28.
- 7 3. Brin I, Tulloch JF, Koroluk L, Philips C. External apical root resorption in Class II
8 malocclusion: a retrospective review of 1- versus 2-phase treatment. *Am J Orthod*
9 *Dentofacial Orthop* 2003;124:151-156.
- 10 4. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM et al.
11 Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial*
12 *Orthop* 2003;123:242-252.
- 13 5. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM et al.
14 Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients:
15 linkage of chromosome-18 marker. *J Dent Res* 2003;82:356-360.
- 16 6. Huang Y, Wang XX, Zhang J, Liu C. Root shortening in patients treated with two-
17 step and en masse space closure procedures with sliding mechanics. *Angle Orthod*
18 2010;80:492-497.
- 19 7. Zhuang L, Bai Y, Meng X. Three-dimensional morphology of root and alveolar
20 trabecular bone during tooth movement using micro-computed tomography. *Angle*
21 *Orthod* 2011;81:420-425.
- 22 8. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root
23 resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*
24 1997;111:301-309.
- 25 9. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption.
26 Part II: The clinical aspects. *Angle Orthod* 2002;72:180-184.
- 27 10. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption.
28 Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod* 2002;72:175-179.
- 29 11. Gulden N, Eggermann T, Zerres K, Beer M, Meinelt A, Diedrich P. Interleukin-1
30 polymorphisms in relation to external apical root resorption (EARR). *J Orofac Orthop*
31 2009;70:20-38.
- 32 12. Mirabella AD, Artun J. Prevalence and severity of apical root resorption of
33 maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Eur J Orthod* 1995;17:93-99.
- 34 13. Remington DN, Joondeph DR, Artun J, Riedel RA, Chapko MK. Long-term
35 evaluation of root resorption occurring during orthodontic treatment. *Am J Orthod*
36 *Dentofacial Orthop* 1989;96:43-46.
- 37 14. Bosshardt DD MV, Nanci A. Root resorption and tissue repair in orthodontically
38 treated human premolars. Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and
39 replacement by implants. Boston: Harvard Society for the Advancement of
40 Orthodontics 1998:425 - 437.
- 41 15. Linge BO, Linge L. Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod*
42 1983;5:173-183.
- 43 16. Levander E, Malmgren O. Evaluation of the risk of root resorption during
44 orthodontic treatment: a study of upper incisors. *Eur J Orthod* 1988;10:30-38.
- 45 17. Malmgren O, Goldson L, Hill C, Orwin A, Petrini L, Lundberg M. Root resorption
46 after orthodontic treatment of traumatized teeth. *Am J Orthod* 1982;82:487-491.
- 47 18. Spurrier SW, Hall SH, Joondeph DR, Shapiro PA, Riedel RA. A comparison of
48 apical root resorption during orthodontic treatment in endodontically treated and vital
49 teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990;97:130-134.

- 1 19. Mavragani M, Vergari A, Selliseth NJ, Boe OE, Wisth PL. A radiographic
2 comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with a standard
3 edgewise and a straight-wire edgewise technique. *Eur J Orthod* 2000;22:665-674.
- 4 20. Hollender L, Ronnerman A, Thilander B. Root resorption, marginal bone support
5 and clinical crown length in orthodontically treated patients. *Eur J Orthod* 1980;2:197-
6 205.
- 7 21. Ngan DC, Kharbanda OP, Byloff FK, Darendeliler MA. The genetic contribution to
8 orthodontic root resorption: a retrospective twin study. *Aust Orthod J* 2004;20:1-9.
- 9 22. Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Al-Qawasmi RA. Genetic Factors in External Apical
10 Root Resorption and Orthodontic Treatment. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:115-
11 122.
- 12 23. Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod*
13 1975;67:522-539.
- 14 24. Vlaskalic V, Boyd RL, Baumrind S. Etiology and sequelae of root resorption.
15 *Semin Orthod* 1998;4:124-131.
- 16 25. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation.
17 *Nature* 2003;423:337-342.
- 18 26. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J*
19 *Periodontal Res* 2005;40:287-293.
- 20 27. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB,
21 Ingvarsson T et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat*
22 *Genet* 2009;41:15-17.
- 23 28. Lacey DL TE, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero
24 A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian
25 YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ.
26 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and
27 activation. *Cell Press* 1998;93:165-176.
- 28 29. Chiba-Falek O, Nussbaum RL. Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat
29 upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture
30 luciferase reporter system. *Hum Mol Genet* 2001;10:3101-3109.
- 31 30. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z et al. Variation in genes
32 involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with
33 bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006;118:568-
34 577.
- 35 31. Xiong DH SH, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ,
36 Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis
37 candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among
38 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene
39 interaction. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1678–1695.
- 40 32. Tan W, Wu H, Zhao J, Derber LA, Lee DM, Shadick NA et al. A functional RANKL
41 polymorphism associated with younger age at onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis*
42 *Rheum* 2010;62:2864-2875.
- 43 33. Takacs I, Lazary A, Kosa JP, Kiss J, Balla B, Nagy Z et al. Allelic variations of
44 RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene
45 expression. *Eur J Endocrinol* 2010;162:423-431.
- 46 34. Soedarsono N, Rabello D, Kamei H, Fuma D, Ishihara Y, Suzuki M et al.
47 Evaluation of RANK/RANKL/OPG gene polymorphisms in aggressive periodontitis. *J*
48 *Periodontal Res* 2006;41:397-404.

- 1 35. Liu G, Wang Y, Wong L. FastTagger: an efficient algorithm for genome-wide tag
2 SNP selection using multi-marker linkage disequilibrium. *BMC Bioinformatics*
3 2010;11:66.
- 4 36. Silva Filho OG FJF, Ozawa TO. Dimensões dos arcos
5 dentários na mal-oclusão de Classe II divisão 1 com deficiência
6 mandibular. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14:30.
- 7 37. Taner T, Ciger S, Sencift Y. Evaluation of apical root resorption following
8 extraction therapy in subjects with Class I and Class II malocclusions. *Eur J Orthod*
9 1999;21:491-496.
- 10 38. Liou EJ, Chang PM. Apical root resorption in orthodontic patients with en-masse
11 maxillary anterior retraction and intrusion with miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial*
12 *Orthop* 2010;137:207-212.
- 13 39. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color
14 and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:177-182.
- 15 40. Linge L, Linge BO. Patient characteristics and treatment variables associated
16 with apical root resorption during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial*
17 *Orthop* 1991;99:35-43.
- 18 41. Mohandesan H, Ravanmehr H, Valaei N. A radiographic analysis of external
19 apical root resorption of maxillary incisors during active orthodontic treatment. *Eur J*
20 *Orthod* 2007;29:134-139.
- 21 42. Trevilatto PC LS. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA
22 fragments. *J Forensic Odontostomatol* 2000;18:9.
- 23 43. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from
24 buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18:148-152.
- 25 44. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with
26 fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3761-3766.
- 27 45. van Loenen M, Dermaut LR, Degrieck J, De Pauw GA. Apical root resorption of
28 upper incisors during the torquing stage of the tip-edge technique. *Eur J Orthod*
29 2007;29:583-588.
- 30 46. Lopatiene K, Dumbravaite A. Risk factors of root resorption after orthodontic
31 treatment. *Stomatologija* 2008;10:89-95.
- 32 47. Nigul K, Jagomagi T. Factors related to apical root resorption of maxillary incisors
33 in orthodontic patients. *Stomatologija* 2006;8:76-79.
- 34 48. Levander E, Malmgren O, Stenback K. Apical root resorption during orthodontic
35 treatment of patients with multiple aplasia: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*
36 1998;20:427-434.
- 37 49. Graber TM VRJ. *Ortodontia: princípios e técnicas atuais*
38 Rio de Janeiro, Brazil: Guanabara Koogan; 2002.
- 39 50. Taithongchai R, Sookkorn K, Killiany DM. Facial and dentoalveolar structure and
40 the prediction of apical root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*
41 1996;110:296-302.
- 42 51. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I.
43 Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:505-510.
- 44 52. Mirabella AD, Artun J. Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior
45 teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:48-55.
- 46 53. Pandis N, Nasika M, Polychronopoulou A, Eliades T. External apical root
47 resorption in patients treated with conventional and self-ligating brackets. *Am J*
48 *Orthod Dentofacial Orthop* 2008;134:646-651.
- 49 54. Baumrind S, Korn EL, Boyd RL. Apical root resorption in orthodontically treated
50 adults. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;110:311-320.

- 1 55. Lupi JE, Handelman CS, Sadowsky C. Prevalence and severity of apical root
2 resorption and alveolar bone loss in orthodontically treated adults. *Am J Orthod*
3 *Dentofacial Orthop* 1996;109:28-37.
- 4 56. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2.
5 Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:138-146.
- 6 57. Kjaer I. Morphological characteristics of dentitions developing excessive root
7 resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod* 1995;17:25-34.
- 8 58. Vardimon AD, Levy T, Weinreb M. Maxillary incisor root resorption after rapid
9 palatal expansion in *Felis catus*. *Eur J Oral Sci* 2005;113:41-46.
- 10 59. Beck BW, Harris EF. Apical root resorption in orthodontically treated subjects:
11 analysis of edgewise and light wire mechanics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*
12 1994;105:350-361.
- 13 60. Reukers EA, Sanderink GC, Kuijpers-Jagtman AM, van't Hof MA. Radiographic
14 evaluation of apical root resorption with 2 different types of edgewise appliances.
15 Results of a randomized clinical trial. *J Orofac Orthop* 1998;59:100-109.
- 16 61. Janson GR, De Luca Canto G, Martins DR, Henriques JF, De Freitas MR. A
17 radiographic comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with 3
18 different fixed appliance techniques. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2000;118:262-
19 273.
- 20 62. Levander E, Malmgren O, Eliasson S. Evaluation of root resorption in relation to
21 two orthodontic treatment regimes. A clinical experimental study. *Eur J Orthod*
22 1994;16:223-228.
- 23 63. Fontana ML, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML, Thum L et al.
24 Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism
25 with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial*
26 *Orthop* 2012;142:339-347.
- 27 64. Sameshima GT, Asgarifar KO. Assessment of root resorption and root shape:
28 periapical vs panoramic films. *Angle Orthod* 2001;71:185-189.
- 29 65. Shaza K. Abass and James K. Hartsfield J. Orthodontics and External Apical
30 Root Resorption. *Semin Orthod* 2007;13:246-256.
- 31 66. Levander E, Bajka R, Malmgren O. Early radiographic diagnosis of apical root
32 resorption during orthodontic treatment: a study of maxillary incisors. *Eur J Orthod*
33 1998;20:57-63.
- 34 67. Levander E, Malmgren O. Long-term follow-up of maxillary incisors with severe
35 apical root resorption. *Eur J Orthod* 2000;22:85-92.
- 36 68. Artun J, Van 't Hullenaar R, Doppel D, Kuijpers-Jagtman AM. Identification of
37 orthodontic patients at risk of severe apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial*
38 *Orthop* 2009;135:448-455.
- 39 69. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Faust
40 DM et al. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic
41 contributions. *Eur J Orthod* 2006;28:13-19.
- 42 70. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJ, Gontijo AI et al.
43 Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical
44 root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:542-546.
- 45 71. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*
46 2001;142:5050-5055.
- 47 72. Trouvin AP, Goeb V. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and
48 osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*
49 2010;5:345-354.

- 1 73. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor
2 activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical
3 implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4514-4521.
- 4 74. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res*
5 *Ther* 2007;9 Suppl 1:S1.
- 6 75. Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N.
7 Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than
8 periodontal ligament cells do in response to PGE(2). *Arch Oral Biol* 2012;57:1377-
9 1384.
- 10 76. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and
11 remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-146.
- 12 77. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and
13 mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795-823.
- 14 78. Dong SS, Liu XG, Chen Y, Guo Y, Wang L, Zhao J et al. Association analyses of
15 RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength
16 index variation in Caucasians. *Calcif Tissue Int* 2009;85:104-112.
- 17 79. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS et al. Association between
18 osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and
19 RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL
20 levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause*
21 2007;14:913-918.
- 22 80. Assmann G, Koenig J, Pfreundschuh M, Epplen JT, Kekow J, Roemer K et al.
23 Genetic variations in genes encoding RANK, RANKL, and OPG in rheumatoid
24 arthritis: a case-control study. *J Rheumatol* 2010;37:900-904.
- 25 81. Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T et al. Associations
26 between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease
27 severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin*
28 *Rheumatol* 2007;26:2137-2141.
- 29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

1 TABELAS

2

Tabela I Resultados para análises univariadas, considerando as variáveis clínicas para os indivíduos com e sem RRAE.						
Dados dos Pacientes	Grupo 1 ¹ (n = 196)		Grupo 2 ² (n = 176)		Univariada	
	N	%	N	%	valor de p	OR (CI 95%)
Sexo						
Masculino	89	45.4	80	45.5	0.993 [§]	0.99 (0.66-1.50)
Feminino	107	54.6	96	54.5		
Idade (anos)^a						
≤ 14 anos	87	44.4	65	36.9	0.144 [§]	1.36 (0.89-2.06)
> 14 anos	109	55.6	111	63.1		
EP						
Não	179	91.3	146	83.0	0.019*	2.16 (1.14-4.07)
Sim	17	8.7	30	17.0		
Elásticos						
Não	169	86.2	142	80.7	0.149 [§]	1.49 (0.86-2.60)
Sim	27	13.8	34	19.3		
ERP						
Não	166	84.7	155	88.1	0.345 [§]	0.75 (0.41-1.36)
Sim	30	15.3	21	11.9		
Pêndulo						
Não	149	76.0	138	78.4	0.584 [§]	0.87 (0.53-1.42)
Sim	47	24.0	38	21.6		
AEB						
Não	182	92.9	166	94.9	0.425 [§]	0.70 (0.29-1.67)
Sim	14	7.1	9	5.1		
Raiz Inicial (mm)^b						
<30	165	84.2	123	69.9	0.001^{*/§}	2.29 (1.39-3.78)
>30	31	15.8	53	30.1		
* Teste exato de Fisher						
§ Qui-quadrado de Pearson						
^a Ponto de corte (14 anos) sugerido pela curva ROC (0.574, p=0.017).						
^b Ponto de corte(30 mm) sugerido pela curva ROC (0.620, p<0.001)						
EP- Extração de pré- molar						
ERM - Expansão rápida da maxila						
AEB- Aparelho extrabucal						
Grupo 1 ¹ = RRAE ≤ 1,43						
Grupo 2 ² = RRAE > 1,43						

3

1

2 **Tabela II** Resultados das análises univariadas de tagSNPs do gene *RANKL* entre os
3 grupos sem RRAE (n = 196) e com RRAE (n = 176)

4

Gene	tag SNP	Variação [1/2]	% de genotipagem	Modelo Genético	Grupos	Genotipagem (%)			Univariada		
						Homozigoto 1	Heterozigoto	Homozigoto 2	p-value	OR (CI 95%)	
<i>RANKL</i>	rs1038434	[C/T]	93.8	Aditivo	Controle	102 (55.1)	68 (33.8)	15 (8.1)	0.200	1.02 (0.47-2.22)	
					Estudo	101 (61.6)	50 (30.5)	13 (7.9)			
				Dominante ¹	Controle	170 (91.5)		15 (8.1)	0.950		
					Estudo	151 (92.1)		13 (7.9)			
				Recessivo ²	Controle	102 (55.1)	83 (44.9)		0.182		0.74 (0.48-1.14)
					Estudo	102 (62.2)	62 (37.8)				
<i>RANKL</i>	rs3742257	[C/T]	97.8	Aditivo	Controle	66 (34.4)	80 (41.7)	45 (23.4)	0.326	1.33 (0.80-2.22)	
					Estudo	55 (32.0)	85 (49.4)	32 (18.6)			
				Dominante ²	Controle	147 (76.6)		45 (23.4)	0.260		
					Estudo	140 (81.4)		32 (18.6)			
				Recessivo ³	Controle	64 (33.3)	128 (66.7)		0.783		1.06 (0.68-1.65)
					Estudo	55 (32.0)	117 (68.0)				
<i>RANKL</i>	rs931273	[C/T]	98.7	Aditivo	Controle	120 (61.9)	63 (32.5)	11 (5.7)	0.590	1.56 (0.60-4.06)	
					Estudo	115 (66.5)	51 (29.5)	7 (4.0)			
				Dominante ³	Controle	182 (93.8)		12 (6.2)	0.356		
					Estudo	166 (96.0)		7 (4.0)			
				Recessivo ⁴	Controle	120 (61.9)	74 (38.1)		0.357		0.81 (0.53-1.25)
					Estudo	115 (66.5)	58 (33.5)				
<i>RANKL</i>	rs12585229	[C/T]	100.0	Aditivo	Controle	131 (66.8)	56 (28.6)	9 (4.6)	0.755	1.36 (0.47-3.91)	
					Estudo	123 (69.9)	47 (26.7)	6 (3.4)			
				Dominante ⁴	Controle	187 (95.4)		9 (4.6)	0.653		
					Estudo	170 (96.6)		6 (3.4)			
				Recessivo ⁵	Controle	131 (66.8)	65 (33.2)		0.453		0.84 (0.54-1.31)
					Estudo	124 (70.5)	52 (29.5)				

§ modelo de regressão logística binária

5 Controle: Grupo de pacientes sem RRAE

6 Estudo: Grupo de pacientes com RRAE

7

8

9

10

11

12

13

14

FIGURAS

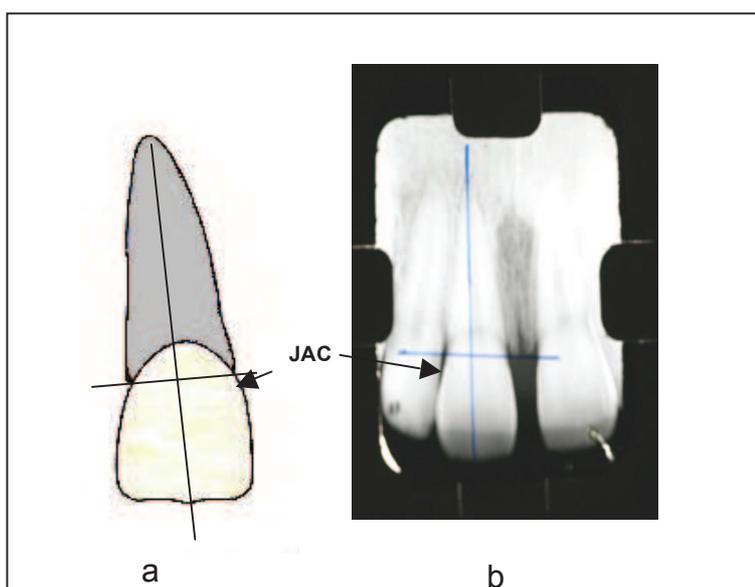


Fig 1. (a) Referências anatômicas para mensurar a RRAE: Junção amelocementária (JAC). (b) Referências para mensuração no raio-x.



Fig 2. Medidas realizadas com o paquímetro digital eletrônico sobre a película de raio-x.

```
#Sat Apr 16 12:43:46 2011: HapMap tag SNPs:4 tag SNPs picked out for population CEU chr13:42046298..42080148 usi
the algorithm-Tagger-multiMarkerTagging
#tag SNPs      Chromosome    Pos      maf
rs1038434     chr13        42065333 0.147
rs3742257     chr13        42071198 0.442
rs931273      chr13        42076583 0.133
rs12585229    chr13        42069666 0.088
```

Fig 3. Marcadores tag SNPs capturados do *International HapMap Project, phase III/Rel#2* (<http://www.hapmap.org>, 2012). Todos os marcadores selecionados apresentaram uma frequência alélica mínima (FAM) de 0,05 na população CEU (residentes de Utah com ascendência europeia do norte e oeste). O parâmetro de corte para definir DL entre dois marcadores foi $r^2 > 0,8$.

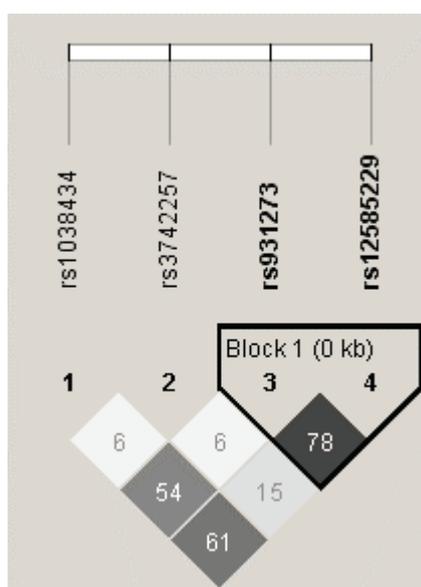


Fig 4. Análise do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs no gene do RANKL. O número dentro de quadrados indica a proporção de % em DL. A intensidade da cor dentro dos quadrados reflete o DL entre dois locus, a intensidade mais escura representa o maior DL entre os SNPs.

ANEXO I - JUSTIFICATIVA PARA A PASSAGEM DIRETA DO MESTRADO PARA O DOUTORADO

O trabalho de Dissertação aqui apresentado refere-se à investigação de 4 tagSNPs - polimorfismos ou variações que capturam toda a informação do gene *RANKL* em termos de variabilidade, e sua associação com a RRAE em indivíduos Classe II, 1ª divisão tratados e não tratados ortodonticamente, com a finalidade de verificar se algum desses polimorfismos poderiam ser considerados marcadores moleculares (ou marcadores genéticos) de suscetibilidade a essa condição buco-dental complexa.

No entanto, o sistema principal de regulação do metabolismo ósseo é formado não apenas pelo mediador (ou citocina) RANKL (ligante que estimula a diferenciação e ativação de osteoclastos), mas por RANK (receptor de RANKL no osteoclasto) e OPG (osteoprotegerina, receptor competidor que antagoniza os efeitos de RANKL, protegendo contra a reabsorção óssea).

Assim, a solicitação de passagem direta do Mestrado para o Doutorado com defesa baseia-se, fundamentalmente, em dois pontos principais, **para a confecção de um único artigo científico a ser submetido para um periódico indexado internacional qualificado da área:**

- a) Pretende-se investigar os três genes, responsáveis pela codificação de RANKL, RANK e OPG, em um total de 42 tagSNPs, para acessar toda a informação genética propiciada por esses três genes no que tange ao controle da suscetibilidade à RRAE;
- b) Sofisticar a análise estatística, comparando 3 grupos: sem tratamento ortodôntico, com tratamento ortodôntico e RRAE $\leq 1,43$ mm, e com tratamento ortodôntico e RRAE $> 1,43$ mm, para checar se o estímulo mecânico da aplicação de forças realmente impacta em algum grau na expressão dos genes do sistema RANKL, RANK e OPG.

ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF
ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

*The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics uses the Elsevier Editorial System (EES), an online manuscript submission and review system. To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** EES website: ees.elsevier.com/ajodo*

Send other correspondence to:

Dr. Vincent G. Kokich, DDS, MSD, Editor-in-Chief

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206) 221-5413

E-mail: vgkokich@u.washington.edu

General Information

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to

act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

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

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

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

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

3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org> . Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced

to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. *Tables.* Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word or Excel, for example) and not as graphic elements.

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

7. *Copyright release.* In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors:

"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material."
Scan the printed copyright release and submit it via EES.

8. Use the International College of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form). If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary

listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

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

10. Systematic Reviews and Meta-Analyses must be accompanied by the current PRISMA checklist and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For complete instructions, see our [Guidelines for Systematic Reviews and Meta-Analyses](#).

11. Randomized Clinical Trials must be accompanied by the current CONSORT statement, checklist, and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For complete instructions, see our [Guidelines for Randomized Clinical Trials](#).

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via EES. Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs, and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from [Case Report Guidelines](#).

Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by orthodontists.

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and our readers.

Letters to the Editor must refer to an article that was published within the previous six (6) months and must be less than 500 words including references. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: vgkokich@u.washington.edu. Submit a signed copyright release with the letter.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials and Special Articles via the Web site.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon their interest and value to subscribers. Send books to the Editor in Chief, Dr. Vincent G. Kokich, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box 357446, Seattle, WA 98195-7446. They will not be returned.

Checklist for authors

- *Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address*
- *Abstract*
- *Article proper, including references and figure legends*
- *Figures, in TIF or EPS format*
- *Tables*
- *Copyright release statement, signed by all authors*
- *Photographic consent statement(s)*
- *ICMJE Conflict of interest statement*