



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

MICHELLE PAIVA WEYDT GALHARDI

**A ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE  
INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B) E DO RECEPTOR DE  
VITAMINA D (VDR) COM A REABSORÇÃO RADICULAR  
APICAL EXTERNA EM PACIENTES ASMÁTICOS  
TRATADOS ORTODONTICAMENTE**

---

Londrina  
2014

MICHELLE PAIVA WEYDT GALHARDI

**A ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE  
INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B) E DO RECEPTOR DE  
VITAMINA D (VDR) COM A REABSORÇÃO RADICULAR  
APICAL EXTERNA EM PACIENTES ASMÁTICOS  
TRATADOS ORTODONTICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Ortodontia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro.

Londrina  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação**  
**Universidade Norte do Paraná**  
**Biblioteca Central**  
**Setor de Tratamento da Informação**

G155a Galhardi, Michelle Paiva Weydt.  
A associação do polimorfismo do gene Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) e do receptor de vitamina D (VDR) com a reabsorção radicular apical externa em pacientes asmáticos tratados ortodonticamente / Michelle Paiva Weydt Gallhardi. Londrina: [s.n.], 2014.  
xi; 80f.

Dissertação (Mestrado). Odontologia. Ortodontia. Universidade Norte do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro

1- Odontologia - dissertação de mestrado - UNOPAR  
2- Ortodontia 3- Asma 4- Reabsorção dentária 5- Polimorfismo genético 6- Interleucina 1 $\beta$ - 7- Vitamina D 8 -Receptor de vitamina D I- Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.23:616-248

MICHELLE PAIVA WEYDT GALHARDI

**A ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE INTERLEUCINA 1  
BETA (IL-1B) E DO RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) COM A  
REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA EM PACIENTES  
ASMÁTICOS TRATADOS ORTODONTICAMENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Ortodontia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Vanessa Pedron Oltramari-  
Navarro  
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

---

Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos  
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Poli-Frederico  
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Dedico esta conquista ao grande amor da  
minha vida, **MAX DIVON**, meu alicerce e abrigo  
hoje e sempre.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a **Deus** que me deu força quando achei que não conseguiria. Que colocou no meu caminho familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram. Que me presenteou com uma turma, vindos de lugares, criações, sonhos, ideias e estilos de vida tão diferentes. Que fez com que nesse tempo eu aprendesse muitas coisas, não só referentes a uma matéria ou outra, mas à vida que nos espera. Muito obrigada por essa conquista senhor! Mas principalmente obrigada por esses 2 anos de convívio com toda essa galera...

Agradeço, especialmente, a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro** pela oportunidade de trabalharmos juntas nesse projeto. Obrigada por ter me adotado com tanto carinho e por fazer do aprendizado, não um trabalho, mas um contentamento. Por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor e assim, fazê-lo cada vez melhor. Parabéns pela brilhante profissional que és! Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Poli-Frederico** mil vezes obrigada...Obrigada por fazer da genética uma matéria apaixonante. Obrigada por não medir esforços em me ensinar e me apoiar na parte laboratorial. Obrigada pela sua disponibilidade e por seu sorriso sempre irradiante. Você é um exemplo e encanto de pessoa!

Ao **Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos** obrigada por aceitar o convite em participar da minha banca, pela simplicidade e por todas as sugestões para que esse trabalho pudesse ter valor científico.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Maria Freire Fernandes-Poletti** obrigada pelo carinho e simpatia desde o primeiro momento. Por ser sempre o nosso porto seguro nos momentos difíceis, compartilhando seu conhecimento de forma gentil e tranquila.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia de Castro Ferreira Conti** obrigada pela forma simples e generosa que compartilha seus conhecimentos dentro e fora da clínica. Sentirei saudades das histórias, que inúmeras vezes, nos fez rir. Você tem um carisma que é só seu.

Ao **Prof. Dr. Renato Rodrigues de Almeida** fica aqui o meu respeito e grande admiração pela capacidade e empenho profissional. Obrigada pelo carinho com a nossa turma.

Ao **Prof. Dr. Márcio Rodrigues de Almeida** obrigada pelo ensinamentos transmitidos na clínica e pelo despertar do senso crítico nessa jornada. Inegavelmente seus conhecimentos esclarecem e transformam. A melhor aula só poderia ter sido ministrada por um professor brilhante.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, representada pelo **Prof. Dr. Alcides Gonini Junior**.

A todos os funcionários da secretaria e da clínica de Odontologia da UNOPAR. Especialmente ao querido **Johne**, pessoa muito querida, que não mede esforços em nos ajudar.

À **Justymara Fernanda dos Santos Serrano**, funcionária da biblioteca da UNOPAR, obrigada por sua gentileza, disponibilidade e conhecimento transmitido.

Ao corpo docente do mestrado em Odontologia da Unopar, especialmente: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Maciel, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen Parron, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Kiss, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucinea Rezende, Prof. Dr. Marcelo Poletti, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandrini Berger, Prof. Dr. Rodrigo Varella, Prof. Dr. Murilo Baena e Prof. Dr. Ricardo Guiraldo** por terem contribuído para minha formação acadêmica.

### **Aos meus amigos de mestrado**

Partimos hoje em busca do destino...Cheios de vida, certo de que triunfaremos. Então não nos veremos mais uma semana inteira, talvez nem todos os anos. Mas certamente, jamais nos esqueceremos de cada um. Embora a vida sempre nos leve a caminhos diferentes, temos a certeza de que a lembrança permanecerá sempre gravada em nossos corações. Essa turminha boa deixará saudades!

Minha amiga **Dariane Ribeiro**, obrigada por todos os momentos compartilhados, sejam de felicidades, angústias, confidências, conhecimentos, esperas em aeroportos, brincos e fardas...Tudo sempre vale a pena quando temos ao lado pessoas queridas.

Agradeço ao meu amigo **Fábio Domingues**, por não medir esforços em me ajudar, seja na prática ou na teórica. Você está no caminho certo, é um professor nato!

Aos amigos **Flávia Diane e Pedro** (quase integrante do mestrado), gostaria de agradecer em primeiro lugar a oportunidade de me apresentar o Jardim Botânico, com a narrativa de um especialista no assunto, o Pedro. Obrigada também pelo carinho com que sempre me receberam em Londrina. Vocês formam um casal nota dez!

Ao meu amiguinho **Giovani Lago**, obrigada pelas boas gargalhadas que demos ao longo do curso, por ser meu personal “mac“, pelas dicas profissionais, enfim, por ser um grande parceiro de todas as horas. Você é um profissional brilhante!

Meu amigo, **Jefferson Schwertner**, além de você ser uma pessoa muito divertida, demonstrou que as adversidades podem ser superadas com brilhantismo. Parabéns pela sua grande evolução!

Ao atleta da turma, **Paulo Rossato** parabéns por ser um campeão no remo e na ortodontia. Obrigada pelo carinho, mas principalmente obrigada pelos momentos divertidos que compartilhamos nesse mestrado.

Minha amiga querida **Thais Soliva**, obrigada por me ensinar que nessa vida de um limão, é possível fazer uma boa limonada, como você mesma diz. Saiba que seu otimismo contagiou a todos que estavam ao seu redor. Você encanta a todos com esse jeito descontraído e meio moleque. Obrigada pela muitas risadas que demos juntas!



## **Agradecimentos especiais**

Aos meus amados avós, **Francisco e Heloisa**, pelo amor incondicional durante toda a vida. Procuo palavras e não encontro para descrever tamanha gratidão. “ Como é grande o meu amor por vocês...”

Ao meu grande amor, amigo e companheiro, **Max Divon**, pela compreensão, carinho e apoio para que esse sonho se tornasse realidade. Você foi fundamental nessa conquista.

A querida **Maria Gisette**, obrigada por me mostrar a luz no final do túnel quando tudo parecia obscuro. Graças a você tive a oportunidade de conhecer pessoas queridas e muito competentes nesse mestrado em Londrina. Obrigada pelo grande incentivo!

A todos os meus amigos que de alguma forma suportaram minhas ausências e falhas, por entenderem que esse era um momento de dedicação a realização desse sonho.

GALHARDI, Michelle Paiva Weydt Galhardi. **A associação do polimorfismo do gene Interleucina 1 Beta (IL-1 $\beta$ ) e do receptor de vitamina D (VDR) com a reabsorção radicular apical externa em pacientes asmáticos tratados ortodonticamente.** 80 f. [Dissertação de Mestrado] – Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

## RESUMO

**Introdução:** Estudos recentes mostram uma associação entre o polimorfismo do gene da Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) com a reabsorção radicular na movimentação ortodôntica. Outro responsável pela regulação no nível de transcrição de certos genes e que influencia a resposta imune e homeostasia óssea é o gene do receptor da vitamina D (VDR). A RRAE também tem sido relacionada aos pacientes asmáticos. **Objetivo:** determinar se pacientes asmáticos sob tratamento ortodôntico apresentam maior severidade da RRAE em dentes anteriores, quando correlacionamos o polimorfismo do gene 1L-1 $\beta$  e do receptor da vitamina D (VDR). **Material e métodos:** A amostra foi composta por 44 pacientes, de ambos os gêneros, com idades entre 15 e 30 anos, divididos em 2 grupos: Asma (n=23) e Controle (n=21). Para tanto, foram realizadas duas análises: radiográfica, por meio da avaliação de radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores, realizadas previamente ao tratamento ortodôntico e 24 meses após o início do tratamento; molecular: a extração do DNA a partir de células epiteliais da mucosa bucal dos pacientes e a análise do polimorfismo no gene da 1L-1 $\beta$  e do receptor de vitamina D (VDR), por meio de PCR-RFLP e PCR em tempo real. O tratamento estatístico foi realizado a partir dos testes t independente, Qui-Quadrado, Análise de Regressão Logística Simples, Coeficiente de Correlação Intraclasse e concordância de Bland & Altman (significância 5%). **Resultados:** Verificou-se que o grupo Asma apresentou maior severidade de RRAE em relação ao grupo Controle (p<0,0001). Além disso, observou-se um desequilíbrio de ligação do polimorfismo da 1L-1 $\beta$  com a RRAE no grupo asmático, ligado a indivíduos portadores de pelo menos um alelo 2 (p=0,037)(OR=1,375; 95%IC = 1,077-1,758; p= 0,011). E indivíduos asmáticos portadores do genótipo heterozigoto para o gene VDR apresentam 1,8 mais chances de desenvolver RRAE mais severa (OR=1,868; 95%IC = 1,336 – 2,613; p=0,0001).

**Palavras-chave:** Ortodontia. Asma. Reabsorção dentária. Polimorfismo genético. Interleucina 1 $\beta$ . Receptor de vitamina D.

GALHARDI, Michelle Paiva Weydt Galhardi. **The association between gene polymorphism of Interleukin 1 beta (IL - 1 $\beta$ ) and vitamin D receptor (VDR) with external apical root resorption in asthmatic patients under orthodontic treatment.** 2014. 80 f. Dissertation (Masters in Dentistry) - Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

**Introduction:** Recent studies have shown an association between gene polymorphism of the Interleukin 1 beta (IL - 1 $\beta$ ) with root resorption in orthodontic tooth movement. The vitamin D receptor (VDR) gene is also considered responsible for regulating the transcription level of certain genes which affect the immune response and bone homeostasis. The external apical root resorption (EARR) has also been related to asthma patients. The aim of this study was to determine, by correlating the polymorphism between the 1L- 1 $\beta$  gene and the vitamin D receptor (VDR) gene, whether asthmatic patients undergoing orthodontic treatment had greater severity of EARR in anterior teeth. **Methods:** The sample consisted of 44 patients of both genders, aged between 15 and 30 years old, divided into 2 groups: asthmatic (n = 23) and control (n = 21). Two analyses were performed: radiographic, using periapical radiographs of maxillary and mandibular incisors, taken prior to the orthodontic treatment and 24 months after treatment start-up; and molecular - DNA was extracted from the buccal mucosal epithelial cells of the patients and the polymorphism of the genes in 1L- 1 $\beta$  and vitamin D receptor (VDR) was analyzed by PCR-RFLP and RT-PCR. Statistical analysis was performed using Independent T-tests, chi-square, Simple Logistic Regression Analysis, Intraclass correlation coefficient and the Bland & Altman agreement (5% significance). **Results:** The asthmatic group showed a greater severity of EARR compared to the control group (p< 0.0001). In addition, there was an imbalance between 1L- 1 $\beta$  polymorphism and EARR in the asthmatic group, related to individuals who carried at least one allele 2 (p = 0.037)(OR=1,375; 95%IC = 1,077-1,758; p= 0,011). Moreover, asthmatic individuals who were carriers of the heterozygous genotype for the VDR gene had 1.8 times more chance to develop a more severe form of EARR (OR = 1.868, 95% CI = 1.336 to 2.613; p = 0.0001).

**Keywords:** Orthodontics. Asthma. Resorption. Genetic polymorphism. Interleukin 1 $\beta$ . Vitamin D receptor.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CCI	Coefficiente de Correlação Intraclasse
DNA	Ácido dextrorribonucléico
DNTP	Dextrorribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio-Padrão
µL	Unidade de medida referente a 1 microlitro
µmol/L	Micromol por litro
pb	Pares de bases
FC	Fator de Correção
C1	Comprimento da coroa antes do início do tratamento
C2	Comprimento da coroa após 24 meses de tratamento
R1	Comprimento da raiz antes do início do tratamento
R2	Comprimento da raiz após 24 meses de tratamento
<i>IL1β</i>	Interleucina 1β
IC	Intervalo de confiança
JCE	Junção Cimento-Esmalte
LP	Ligamento Periodontal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
OR	Razão de chance
PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição
RRAE	Reabsorção radicular apical externa
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UNOPAR	Universidade Norte do Paraná
VDR	Receptor da vitamina D
$\chi^2$	Teste do Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
2.1	ASMA.....	13
2.2	REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA (RRAE) .....	15
2.3	POLIMORFISMO .....	18
2.3.1	Polimorfismo da Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) (rs 1143634).....	19
2.3.2	Polimorfismo no Gene do Receptor de Vitamina D (VDR) (rs 731236) .....	21
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>75</b>
	Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>77</b>
	Anexo A - Parecer Consubstanciado do CEP .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

A reabsorção radicular apical externa (RRAE) é um efeito colateral do tratamento ortodôntico que resulta na perda irreversível da estrutura radicular<sup>1</sup>. KUROL et al.<sup>2</sup> relataram que 93% dos adolescentes tratados ortodonticamente apresentam algum grau de reabsorção radicular.

Ainda que o mecanismo de RRAE não esteja completamente esclarecido, há evidências de que citocinas contribuam de maneira significativa na sua etiopatogênese e progressão<sup>1,3</sup>. Produzidas em resposta ao processo inflamatório, as citocinas são secretadas por diversas células<sup>4,5</sup> e contribuem na quimiotaxia, diferenciação e ativação de osteoclastos e seus precursores<sup>6</sup>. Também tem sido relatado que há uma associação da reabsorção dentária com o polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$ <sup>1,7,8</sup>.

Outro polimorfismo fortemente relacionado à RRAE ocorre no gene do VDR<sup>9</sup>. O VDR é uma proteína nuclear<sup>10</sup>, receptora de vitamina D, que pode estar relacionada a esse processo. No momento em que a vitamina D se liga ao seu receptor, ocorre a formação de um complexo capaz de estimular a transcrição de genes, cujo produto pode promover a diferenciação osteoclástica<sup>11</sup>.

A RRAE também tem sido associada a mediadores inflamatórios produzidos na asma<sup>12-15</sup>. A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas, cujas causas são multifatoriais e incluem uma mistura complexa de fatores imunológicos, ambientais e genéticos<sup>16</sup>.

Como ainda não existe um mecanismo seguro que determine a predisposição à reabsorção radicular do paciente que se submeterá ao tratamento ortodôntico, a investigação da influência do polimorfismo genético no gene da IL-1 $\beta$  e no gene VDR, constitui uma ferramenta importante na prevenção da RRAE, especialmente em pacientes asmáticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão deste capítulo, a Revisão de Literatura será dividida em tópicos, de acordo com a sequência a seguir:

### 2.1 Asma

### 2.2 Reabsorção radicular apical externa (RRAE)

### 2.3 Polimorfismo

#### 2.3.1 Polimorfismo da Interleucina 1 $\beta$ (*IL-1 $\beta$* )

#### 2.3.2 Polimorfismo no gene do receptor de vitamina D (VDR).

### 2.1 ASMA

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual diversas células e seus produtos estão envolvidos. Entre as células inflamatórias, destacam-se os mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. Dos mediadores inflamatórios já identificados como participantes do processo inflamatório, destacam-se quimiocinas, citocinas, eicosanóides, histamina e óxido nítrico<sup>17</sup>.

Sua prevalência está em torno de 1 a 8% na população mundial<sup>18</sup>. Contudo, esta doença tem apresentado um aumento significativo em sua incidência nos últimos anos, tornando-se um problema crescente de saúde pública, com mais de 300 milhões de portadores em todo mundo. Estima-se que mais 100 milhões possam ser diagnosticados com asma até 2025<sup>18</sup>.

A inflamação das vias aéreas na asma é regulada mutuamente por uma série de citocinas e elementos inflamatórios, que podem ser determinados por fatores genéticos e ambientais<sup>19</sup>. Portanto, sua etiologia é complexa e multifatorial<sup>20</sup>.

Essa interação entre fatores genéticos e estímulos ambientais contribui para o desenvolvimento de uma resposta imune mediada, principalmente pela ativação de linfócitos T helper 2<sup>21</sup>, que induzem à produção de IgE, promovendo a eosinofilia e a inflamação das vias aéreas<sup>22,23</sup>. As reações inflamatórias nos pacientes asmáticos são caracterizadas por um aumento na quantidade de mastócitos, células epiteliais, eosinófilos, linfócitos e mediadores inflamatórios. Uma vez liberados esses mediadores, observa-se

broncoespasmo, congestão vascular e edema do tecido, além de aumento generalizado na celularidade e na quantidade de capilares<sup>20</sup>.

Assim como na asma, durante a movimentação ortodôntica encontramos uma resposta inflamatória<sup>24</sup> no periodonto, caracterizado pelo aumento no calibre dos vasos do ligamento periodontal e mudanças estruturais nesse tecido<sup>25</sup>. Na fase inicial de movimentação dentária, existe um aumento na permeabilidade vascular e no infiltrado de leucócitos<sup>26</sup>. Células imunes recrutadas juntamente com células nativas, tais como fibroblastos e osteoblastos, produzem citocinas inflamatórias, além de linfócitos, monócitos e fatores quimiotáticos<sup>27</sup>. O aumento da permeabilidade vascular e dos infiltrados inflamatórios diminui o pH e favorece a chegada de células clásticas<sup>20</sup>. Por isso, a possível relação entre a reabsorção radicular ortodôntica e a asma já foi investigada por alguns autores<sup>12-15</sup>.

Davidovitch et al.<sup>13</sup>, em uma revisão de literatura, questionaram se mediadores inflamatórios gerados fora do ligamento periodontal influenciavam interações celulares envolvidas na RRAE, por meio da ativação de osteoclastos. Neste trabalho, os autores apontaram a asma como uma possível condição favorável à produção de tais mediadores químicos, que contribuiriam para o aumento do processo da reabsorção radicular.

Essa constatação também foi verificada por McNab et al.<sup>14</sup>, cujo objetivo do estudo era determinar se pacientes asmáticos apresentavam maior incidência ou gravidade da RRAE durante o tratamento ortodôntico. Por meio da radiografia panorâmica, os primeiros e segundos pré-molares e os primeiros molares de 99 pacientes saudáveis e 44 asmáticos foram analisados após tratamento ortodôntico. Cada dente foi avaliado individualmente para observar se havia um sítio preferencial de reabsorção. Os autores observaram um aumento da incidência da reabsorção em dentes posteriores de pacientes asmáticos, comparados àqueles saudáveis. No grupo dos asmáticos, aqueles medicados apresentaram onze vezes mais chance (OR =11,4) de desenvolver RRAE após o tratamento ortodôntico; enquanto aqueles não medicados apresentaram um risco sete vezes maior (OR=7,7). Os autores relataram que esse aumento poderia estar relacionado às alterações no sistema



imunológico.

No ano de 2000, Davidovitch et al.<sup>12</sup> investigaram se indivíduos com o sistema imunológico comprometido poderiam apresentar um risco elevado para o desenvolvimento de reabsorção radicular excessiva. Os autores verificaram que a incidência de asma, alergias e estresse foi significativamente maior em pacientes que sofreram reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico.

Em outro estudo clínico realizado por Nishioka et al.<sup>15</sup>, objetivou-se determinar o grau de associação entre a reabsorção radicular no tratamento ortodôntico e os fatores do sistema imune em uma população japonesa. Para isso, foram avaliadas radiografias panorâmicas antes e após o tratamento ortodôntico com aparelho *edgewise*, realizado em 581 pacientes japoneses, com vistas a observar a possível reabsorção radicular em todos os dentes. Nesta amostra, a asma foi considerada um fator de alto risco, com quatro vezes mais chance (OR=4,3) para o desenvolvimento da RRAE na população estudada.

Machado et al.<sup>20</sup>, foram os primeiros autores a verificar as características do ligamento periodontal (LP) durante a movimentação ortodôntica na asma induzida. Os autores analisaram os aspectos histomorfológicos do LP de 32 ratos, divididos em quatro grupos: com e sem asma alérgica induzida, com presença ou ausência de movimentação ortodôntica. A análise histomorfométrica demonstrou que a resposta à força ortodôntica foi mais exacerbada nos animais com asma, que apresentaram o LP mais comprimido na área de pressão e mais estirado na zona de tração. Os resultados indicaram que, em ratos, a asma promoveu um aumento na resposta provocada pela movimentação ortodôntica. Contudo, os autores não quantificaram a RRAE durante este estudo.

Considerando os aspectos destacados, constatou-se a necessidade de um estudo aprofundado acerca da severidade da RRAE em pacientes asmáticos, durante o tratamento ortodôntico.

## 2.2 REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA (RRAE)

A movimentação ortodôntica pode representar a causa mais

freqüente de reabsorção radicular no mundo moderno<sup>28</sup>. Constitui uma condição relacionada tanto a processos fisiológicos quanto patológicos, que resulta na perda de dentina, cemento e osso<sup>29</sup>.

Durante a realização da movimentação ortodôntica, a concentração de forças no periodonto, principalmente no terço apical, pode desequilibrar a homeostase local, ocasionando a perda da camada superficial das células que protegem a raiz do dente e, juntamente com a ação das células clásticas<sup>28</sup>, podem predispor as raízes dentárias à RRAE<sup>30</sup>.

A prevalência da RRAE é alta<sup>28</sup> e embora o tratamento ortodôntico esteja associado à RRAE em incisivos superiores na maioria dos pacientes, mais de um terço das pessoas tratadas ortodonticamente apresentam experiência de reabsorção maior que 3mm e 2 a 5% da população demonstram reabsorção superior a 5mm<sup>31</sup>.

Diversos estudos<sup>32-36</sup> tem sugerido a etiologia multifatorial desta patologia. Fatores locais relacionados ao tratamento, dentre eles a carga mecânica, a magnitude e a direção da força aplicada sobre os dentes e o tempo de tratamento, são considerados fatores relevantes na suscetibilidade à RRAE. Porém, esta patologia parece estar na dependência de fatores genéticos<sup>1,7,34,37-39</sup>.

O primeiro pesquisador a destacar a correlação entre a RRAE e a hereditariedade foi Newman<sup>40</sup>, em 1975. Em seu estudo, foram investigados fatores como a influência genética, causas sistêmicas, tipo de má oclusão, histórias médica e odontológica pregressas. Neste trabalho, conclui-se que dentes com raízes curtas demonstraram maior reabsorção após a movimentação dentária ortodôntica, embora o padrão de herança ainda não estivesse definido.

Harris et al.<sup>38</sup> avaliaram o componente hereditário para reabsorção radicular em pacientes tratados ortodonticamente. Sua amostra consistiu de 206 adolescentes, sendo 103 pares de irmãos, tratados com a mesma técnica ortodôntica (*edgewise*). Os autores utilizaram telerradiografias em norma lateral para quantificar a reabsorção radicular de incisivos superiores e inferiores e radiografias panorâmicas para observar os primeiros molares direito e esquerdo de ambos os maxilares. Ao final do estudo, concluíram que embora a natureza da má oclusão, o plano de tratamento, a técnica ortodôntica

e o ortodontista tenham sido os mesmos, existiu uma diferença considerável de reabsorção radicular entre os pacientes. Uma possível explicação para essa diferença seria o genótipo, que modularia sua suscetibilidade à RRAE. Alguns indivíduos parecem estar intrinsecamente dotados de resistência à reabsorção apical, mesmo sofrendo o estresse da mecânica ortodôntica; outros são propensos a experimentar reabsorção severa sob as mesmas condições de tratamento.

Hartsfield et al.<sup>34</sup> ao analisarem a influência de fatores genéticos na reabsorção radicular em pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico, constataram que a reabsorção é uma sequela comum, embora ocorra também em pacientes não tratados ortodonticamente. O grau da reabsorção radicular associado à movimentação ortodôntica sofre influência de fatores individuais e gerais. Os fatores genéticos respondem por pelo menos 50% da variação da RRAE. Os autores fornecem também um ponto de partida para a investigação de genes candidatos, como o polimorfismo no gene da *IL-1 $\beta$* , descrito como responsável por 15% da variação total de reabsorção nos incisivos superiores submetidos ao tratamento ortodôntico.

Segundo Ngan<sup>39</sup> uma limitação para avaliar as causas da RRAE é identificar a ação de fatores genéticos e ambientais durante o tratamento ortodôntico. Em um estudo retrospectivo com gêmeos (16 homozigotos e 10 heterozigotos), que apresentavam a mesma má oclusão e haviam sido tratados com mesma técnica pelo mesmo profissional, os autores investigaram a contribuição da genética para a RRAE. Por meio de radiografias panorâmicas, mediu-se o comprimento pré e pós tratamento de incisivos superiores e inferiores, e dos molares inferiores. Embora tenha sido relatada a necessidade de uma amostra maior, o estudo concluiu que existe um componente genético para a reabsorção, uma vez que esta não foi dependente do comprimento radicular ao início do tratamento.

Em 2006, Al-Qawasmi et al.<sup>37</sup> pesquisaram o efeito de algumas características genéticas na predisposição ou resistência para o desenvolvimento de reabsorção radicular associada ao tratamento ortodôntico. Camundongos machos de oito linhagens, distribuídos aleatoriamente em grupos controle e experimental, receberam aparelho ortodôntico no primeiro molar superior esquerdo. A análise histológica foi utilizada para quantificar a

reabsorção radicular, identificando uma suscetibilidade sete vezes maior em camundongos suscetíveis comparados aos resistentes à RRAE. Esses autores confirmaram a existência de uma variação na severidade da reabsorção radicular entre as diferentes linhagens, mesmo quando fatores como idade, gênero, alimentação, magnitude e duração da força eram controlados. Além disso, os autores demonstraram que o genótipo é um fator que influencia significativamente a variabilidade da resposta à reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica. Ainda, ressaltaram a importância da análise genética com diferentes linhagens de camundongos para a melhor compreensão da patogênese da RRAE e dos genes candidatos que poderiam influenciar essa variabilidade durante a mecânica ortodôntica.

A RRAE pode ocorrer em quase todos os dentes, sendo mais evidente nos incisivos centrais e laterais superiores e inferiores, variando de acordo com a sua severidade<sup>41-45</sup>. Há uma maior predisposição à reabsorção radicular nos incisivos superiores, seguidos dos incisivos inferiores<sup>42,45,46</sup> e mais acentuada nos incisivos laterais comparados aos incisivos centrais<sup>45,47</sup>.

Para o correto diagnóstico da reabsorção radicular, é importante a realização de um exame radiográfico apropriado<sup>34</sup>. As radiografias bidimensionais (2D), incluindo periapical e panorâmica, ainda são as mais utilizadas para a verificação de RRAE<sup>37,48</sup>. Contudo, em 2009 Dudic et al.<sup>48</sup> realizaram um estudo para determinar a precisão da radiografia panorâmica na presença de reabsorção. Os resultados sugeriram que a radiografia panorâmica não é o exame mais indicado para essa avaliação, uma vez que pode superestimar a RRAE. Sameshina et al.<sup>45</sup> relataram que essa distorção pode chegar a 20% quando comparada à radiografia periapical. Alguns autores<sup>35,45</sup> consideram a radiografia periapical, pela técnica do paralelismo, o melhor exame para avaliar o tamanho dentário e estimar a reabsorção radicular.

### 2.3 POLIMORFISMO

O polimorfismo se refere à existência de 2 ou mais alelos, presentes no mesmo *locus*. Cada alelo ocorre numa frequência superior a 1% na população, sendo denominado de alelo polimórfico<sup>49</sup>.

A alta evidência de ligação do polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$  com a manifestação clínica da RRAE foi reportada por Al-Qawasmi<sup>1</sup>. Os autores afirmaram que indivíduos homozigotos para o alelo 1 apresentam 5,6 vezes (OR=5,6) mais chance de desenvolver RRAE maior que 2mm.

Estudos recentes<sup>20,50</sup> identificaram variações genéticas no receptor da vitamina D, denominadas de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs). As variações nesses receptores podem resultar em efeitos biológicos<sup>51</sup>, ou até na incapacidade completa da ligação da vitamina D com o seu receptor (VDR), ocasionando a hipovitaminose D, mesmo em indivíduos com níveis séricos ótimos desta vitamina<sup>52</sup>. O polimorfismo no VDR tem sido associado à presença de asma<sup>50</sup>, à alteração no *turnover* ósseo com consequente aumento da perda mineral<sup>53</sup>, à doença periodontal<sup>54</sup> e à reabsorção apical externa<sup>49</sup>.

### 2.3.1 Polimorfismo da Interleucina 1 $\beta$ (*IL-1 $\beta$* ) (rs 1143634)

Existem evidências de que algumas citocinas estejam fortemente relacionadas a etiopatogênese e progressão da RRAE<sup>1,3,5</sup>.

As citocinas são proteínas solúveis que atuam como mensageiras na transmissão de sinais para outras células. Elas promovem a reabsorção óssea<sup>55</sup> e são secretadas por diversas células, em resposta ao processo inflamatório<sup>4</sup>.

A aplicação de força no ligamento periodontal, durante a movimentação ortodôntica, induziu a produção de interleucina 1 $\beta$  e a remodelação óssea em camundongos e humanos<sup>56,57</sup>.

A interleucina 1 $\beta$  é uma citocina potente na estimulação da atividade osteoclástica, atraindo leucócitos e outras células mediadoras no processo de remodelação óssea<sup>58</sup>. Esta citocina tem sido identificada como um importante biomarcador na movimentação ortodôntica<sup>57</sup>.

Al-Qawasmi et al.<sup>1</sup>, ao analisarem a suscetibilidade individual à RRAE, descreveram a existência de um marcador genético (polimorfismo no gene da interleucina 1 $\beta$ ) que identificava os indivíduos com maior propensão à reabsorção dentária. Segundo esses autores, essa predisposição é aumentada em 5 a 6% em indivíduos homozigotos para o alelo 1 do gene da 1L- $\beta$ , quando

comparados àqueles heterozigotos. Essa conclusão foi obtida após a análise do DNA de 35 famílias americanas, cujo material genético foi extraído de células da mucosa bucal. Isto se deve ao fato dessas citocinas serem produzidas por monócitos/macrófagos que, em quantidade excessiva, podem induzir mecanismos de reabsorção óssea, resultando em destruição do tecido conjuntivo e osso alveolar. Os autores sugeriram que uma baixa produção da  $1L-\beta$  resultaria em uma remodelação óssea menos catabólica na interface do osso cortical com o ligamento periodontal, devido à diminuição dos osteoclastos associados aos níveis mais baixos dessa citocina. Isso promoveria um estresse prolongado na raiz do dente, com áreas de necrose e consequente reabsorção radicular.

Silva Filho et al.<sup>8</sup> pesquisaram a relação do polimorfismo no gene da interleucina  $1\beta$  com a RRAE. O estudo avaliou 50 pacientes, na faixa etária de 12 a 30 anos, tratados ortodonticamente durante 2 anos. O polimorfismo foi analisado por meio da PCR-RFLP. Neste trabalho, o genótipo homozigoto para o alelo 1 esteve presente em 96,6% dos indivíduos com RRAE, mostrando assim que o polimorfismo no gene da interleucina  $1\beta$  apresentou uma associação estatisticamente significativamente com a presença de reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica. Com dados tão significantes, os autores sugeriram o exame do polimorfismo desse gene como um exame complementar para o tratamento ortodôntico.

Também Bastos Lages et al.<sup>7</sup> estudaram o polimorfismo desse gene com a RRAE. Foram avaliados 61 pacientes ortodônticos, divididos em 2 grupos: 23 indivíduos com reabsorção radicular maior que 2mm e 38 indivíduos com reabsorção menor que 2mm. A presença ou ausência de RRAE foi verificada por meio de radiografias periapicais, analisadas antes e após o tratamento ortodôntico. Houve diferenças importantes entre as frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo do gene  $1L-1\beta$ , entre o grupo afetado e não afetado pela reabsorção. Observou-se que indivíduos com o genótipo 1/1 apresentavam uma probabilidade sete vezes maior (OR = 7,3) de desenvolver RRAE, comparados àqueles com o genótipo 2/2. Concluiu-se, então, que indivíduos homozigotos para o alelo 1 apresentam maior predisposição para a reabsorção radicular, e indivíduos homozigotos para o alelo 2 são mais protegidos a esse efeito indesejável do tratamento ortodôntico. Segundo os

autores, a confirmação da influência de polimorfismos genéticos pode representar um recurso importante na prevenção da reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica.

Gulden et al.<sup>59</sup> ao comparar 49 pacientes com reabsorção radicular a 162 pacientes que não apresentavam esse sinal (grupo controle), também verificaram associação da RRAE com o polimorfismo da *IL-1 $\beta$* . Porém, os autores verificaram que esta associação estava relacionada ao alelo 2 da *IL-1 $\beta$* , e observaram que o alelo 1 era mais frequente no grupo controle. Assim, os resultados encontrados no referido estudo diferem daqueles descritos por Al-Qawasmi et al.<sup>1</sup> em 2003.

### 2.3.2 Polimorfismo no Gene do Receptor de Vitamina D (*VDR*) (rs 731236)

A vitamina D representa um fator importante para o desenvolvimento do tecido ósseo, pois participa de forma ativa na manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo<sup>60</sup>. Além disso, está envolvida na função neuromuscular e na inflamação<sup>52</sup>.

Estima-se que 80% a 90% da vitamina D corpórea seja adquirida pela síntese cutânea e o restante é obtido por meio da dieta<sup>61</sup>. Sua forma ativa, a 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> [ 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ], é obtida após sua metabolização no fígado e, posteriormente, nos rins<sup>62</sup>.

Além dos níveis séricos para seu correto funcionamento, a vitamina D depende da presença de receptores de vitamina D (*VDR*)<sup>63</sup>, codificado pelo gene *VDR*. O *VDR* é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição<sup>63</sup> e está expresso em diferentes células como osteoblastos<sup>64</sup>, linfócitos, macrófagos e células B pancreáticas<sup>65</sup>.

Após sua ativação pela vitamina D, o *VDR* forma um heterodímero e se liga a elementos da resposta hormonal no DNA, resultando na expressão de proteínas específicas. Variações nesse receptor, denominadas polimorfismos, podem determinar defeitos ou incapacitar de forma completa a ligação da vitamina D com seu receptor, ocasionando uma diminuição dessa vitamina, mesmo em indivíduos com níveis séricos ótimos<sup>52</sup>.

Verifica-se que indivíduos com hipovitaminose D apresentam uma concentração menor de IL-10, que leva ao aumento inflamação das vias

aéreas e à resistência aos corticóides. Além disso, estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando assim a obstrução e hiperresponsividade brônquica<sup>66</sup>.

Estudos epidemiológicos confirmaram a existência de uma associação entre o polimorfismo do gene *VDR* e o desenvolvimento da asma<sup>9,67</sup>, assim como uma relação direta entre a deficiência de vitamina D e a severidade da asma<sup>50,68-70</sup>.

Montero-Arias et al.<sup>70</sup> avaliaram a relação entre os níveis de vitamina D, marcadores de alergia (IgE total, contagem de eosinófilos e rinite alérgica), função pulmonar e severidade da asma. Para isso, avaliaram 121 adultos asmáticos, com idade superior a 18 anos. Foram coletadas amostras de sangue e as informações médicas obtidas por meio do prontuário médico. O principal resultado desse estudo foi a associação significativa entre os níveis de vitamina D e o aumento na severidade da asma. Pacientes com insuficiência de vitamina D apresentavam cinco vezes mais chance (OR=5,4) de desenvolverem asma severa, aumentando também as chances de hospitalização pela doença. Não foi encontrada, neste estudo, associação entre os níveis de vitamina D e os marcadores de alergia.

Brehm et al.<sup>69</sup> analisaram a associação da vitamina D com as manifestações severas da asma em crianças. Este estudo transversal foi realizado com 560 crianças, na faixa etária de 6 a 14 anos, divididas em 2 grupos: com asma (n= 287) e sem asma (n= 273). Foram avaliados prontuários preenchidos por responsáveis, exames de sangue e espirometria. Os resultados mostraram que a insuficiência de vitamina D foi associada à exacerbação da asma, independente da ascendência racial, atopia ou marcadores de severidade para a doença.

O mesmo resultado foi encontrado por Bener et al.<sup>68</sup> ao avaliarem os níveis séricos de vitamina D em crianças asmáticas, no período de 2009 a 2010. O estudo contou com a participação de 483 crianças no grupo experimental e 483 no grupo controle, todas na faixa etária até 16 anos. O diagnóstico da asma foi realizado por um especialista por meio de exame físico, além de questionários e coleta de sangue. O estudo revelou que a deficiência de vitamina D foi o maior preditor de asma nas crianças, pois a maioria delas apresentavam uma deficiência dessa vitamina significativamente



maior que no grupo controle.

A associação do polimorfismo no gene da vitamina D com a suscetibilidade a asma foi realizada por Maalmi et al.<sup>50</sup>. Um total de 155 crianças asmáticas (média de idade de 9,1 anos) e 255 crianças saudáveis (média de idade de 9,5 anos) foram recrutadas para a pesquisa. O diagnóstico e a classificação da gravidade clínica da doença foram baseados nos sinais clínicos e na função pulmonar. Os pacientes foram classificados como asma leve (n= 82), moderada (n=63) e severa (n=10). Para a análise molecular, foi realizado PCR-RFLP. As frequências genótípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados mostraram que indivíduos portadores do genótipo “Tt ou TT” mostraram associação estatisticamente significativa com a asma em comparação àqueles que partilham o genótipo “tt”. Os indivíduos que possuíam um ou dois alelos “T” apresentaram duas vezes mais chance de desenvolver a asma (OR=2,33). Além disso, a categorização dos níveis de vitamina D revelou que 61,3% das crianças asmáticas apresentavam níveis insuficientes de vitamina D. A deficiência de vitamina D pode estar relacionada à alimentação e à falta de exposição ao sol, mas também está ligada a fatores genéticos.

Portanto, a hipovitaminose D é comum em pacientes asmáticos<sup>23,69,71</sup> e o aumento nas concentrações dessa vitamina está associado a melhora na função pulmonar e na resposta aos corticóides<sup>72</sup>, assim como confere proteção contra exacerbações graves da doença<sup>69</sup>.

A vitamina D também tem sido relacionada a outras patologias, como por exemplo a RRAE. Em 2012, Fontana et al.<sup>49</sup> avaliaram a associação do polimorfismo no gene receptor da vitamina D com a reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico. A análise da reabsorção foi realizada por meio de radiografias periapicais de incisivos superiores de 377 pacientes, divididos em três grupos: 160 pacientes com reabsorção menor que 1,43 mm, 179 com reabsorção maior que 1,43 mm e 38 pacientes não tratados (grupo controle). Neste estudo, conclui-se que o polimorfismo no gene receptor da vitamina D apresentou associação com a RRAE. Os autores observaram que genótipos contendo o alelo “C” aumentaram a estabilidade do RNAm e a expressão do receptor da vitamina D, sendo fracamente associado à proteção contra a RRAE em pacientes ortodônticos (OR= 0,29).

Desta forma, um estudo mais aprofundado sobre o polimorfismo desse gene e sua associação com a reabsorção radicular apical externa, em pacientes asmáticos, parece ser de grande relevância na prevenção de respostas indesejáveis durante o tratamento ortodôntico.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi determinar se pacientes asmáticos, sob tratamento ortodôntico, apresentam maior severidade da RRAE em dentes anteriores quando correlacionados ao polimorfismo do gene *1L-1 $\beta$*  e do gene receptor da vitamina D (*VDR*).

## 4 ARTIGO 1

### ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA INTERLEUCINA 1 BETA (rs 1143634) COM A REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA EM PACIENTES ASMÁTICOS TRATADOS ORTODONTICAMENTE

#### RESUMO

**Introdução:** Estudos recentes demonstraram uma associação entre o polimorfismo do gene da Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) com a reabsorção radicular apical externa (RRAE) na movimentação ortodôntica. A RRAE também tem sido relacionada aos pacientes asmáticos, uma vez que mediadores inflamatórios dessa patologia podem atuar sinergicamente nesse processo. **Objetivo:** determinar se pacientes asmáticos, sob tratamento ortodôntico, apresentam maior severidade da RRAE em dentes anteriores, quando correlacionados ao polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$ . **Materiais e métodos:** A amostra foi composta por 44 pacientes, de ambos os gêneros, com média de idade de 16 anos ( $\pm 6,4$ ), divididos em 2 grupos: Asma (n=23) e Controle (n=21). Para tanto, foram realizadas duas análises: radiográfica, por meio da avaliação de radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores, realizadas antes e 24 meses após o início do tratamento; molecular, extração do DNA a partir de células epiteliais da mucosa bucal dos pacientes e a análise do polimorfismo no gene da IL-1 $\beta$  (PCR-RFLP). O tratamento estatístico foi realizado a partir dos testes t independente, Qui-Quadrado, Análise de Regressão Logística Simples, Coeficiente de Correlação Intraclasse e concordância de Bland & Altman (significância 5%). **Resultados:** Verificou-se que o grupo Asma apresentou maior severidade de RRAE em relação ao grupo Controle ( $p < 0,0001$ ). Além disso, observou-se um desequilíbrio de ligação do polimorfismo da IL-1 $\beta$  com a RRAE no grupo asmático, ligado a indivíduos portadores de pelo menos um alelo 2 ( $p = 0,037$ ). Com base nos resultados, conclui-se que o polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$  está associado à reabsorção radicular em pacientes asmáticos.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Asma. Reabsorção dentária. Polimorfismo genético. Interleucina 1 $\beta$ .

#### INTRODUÇÃO

A reabsorção radicular apical externa (RRAE) é uma complicação comum do tratamento ortodôntico, que resulta na perda irreversível da estrutura radicular<sup>1-4</sup>. KUROL et al.<sup>5</sup> relataram que 93% dos adolescentes tratados ortodonticamente apresentam algum grau de reabsorção radicular.

Durante a movimentação ortodôntica, a concentração de forças no periodonto, principalmente no terço apical, pode desequilibrar a homeostase

local, ocasionando a perda da camada superficial das células que protegem a raiz do dente e, aliada à ação das células clásticas<sup>6</sup>, predispõe as raízes dentárias à RRAE<sup>1</sup>.

Embora algum grau de RRAE seja esperado durante o tratamento ortodôntico<sup>5</sup>, mais de um terço dos pacientes submetidos à mecânica ortodôntica apresentam experiência de reabsorção maior que 3mm e 2 a 5% da população demonstram reabsorção superior a 5mm<sup>7,8</sup>.

Diversos estudos<sup>9-13</sup> tem sugerido a etiologia multifatorial desta patologia. Fatores locais relacionados ao tratamento, dentre eles a carga mecânica, a magnitude e a direção da força aplicada sobre os dentes e o tempo de tratamento, são considerados fatores relevantes na suscetibilidade à RRAE. Porém, esta patologia parece também estar associada a fatores genéticos<sup>3,11,14-17</sup>.

O primeiro estudo a destacar a correlação entre a RRAE e a hereditariedade foi realizado por Newman<sup>18</sup>. Contudo, Al-Qawasmi et al.<sup>14</sup> foi o primeiro a descrever a existência de um marcador genético (polimorfismo no gene da interleucina 1 $\beta$ ), que identificava os indivíduos com maior propensão à reabsorção dentária.

Ainda que o mecanismo de RRAE não esteja completamente esclarecido, há evidências de que algumas citocinas contribuam de maneira significativa na sua etiopatogênese e progressão<sup>14,19</sup>. Produzidas em resposta ao processo inflamatório, as citocinas são secretadas por diversas células<sup>20,21</sup> e contribuem na quimiotaxia, diferenciação e ativação de osteoclastos e seus precursores<sup>22</sup>.

Por outro lado, a reabsorção radicular apical externa também tem sido associada a mediadores inflamatórios produzidos em pacientes com asma<sup>23-26</sup>. A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas, que inclui uma mistura complexa de fatores imunológicos, ambientais e genéticos<sup>27</sup>. Sua prevalência está em torno de 1 a 8% na população mundial<sup>28</sup>. Contudo, esta doença tem apresentado um aumento significativo em sua incidência nos últimos anos, tornando-se um problema crescente de saúde pública, com mais de 300 milhões de portadores em todo mundo, e estima-se que mais 100 milhões possam ser diagnosticados com asma até 2025<sup>28</sup>.

Como ainda não existe um mecanismo seguro que determine a

predisposição à reabsorção radicular do paciente que se submeterá ao tratamento ortodôntico, a investigação da influência do polimorfismo genético no gene da IL-1 $\beta$ , especialmente em pacientes asmáticos, constitui uma ferramenta importante na prevenção à RRAE.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) (Pt / 276648) (Anexo 1). Todos os indivíduos incluídos no estudo, ou seus responsáveis legais, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

### **AMOSTRA**

A amostra foi composta por 44 pacientes, de ambos os gêneros, provenientes do curso de mestrado em Ortodontia, da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). A amostra foi dividida em 2 grupos: Asma (n=23, média de idade: 20,4  $\pm$  8,1 anos), pacientes portadores de asma brônquica; Controle (n=21, média de idade: 18,8  $\pm$  4,5 anos), pacientes não portadores de asma brônquica. Os pacientes asmáticos foram provenientes do Ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, no qual receberam diagnóstico da asma por um pneumologista.

Para serem incluídos no estudo, os pacientes não poderiam ter sido submetidos a tratamento ortodôntico prévio. Ainda, foram excluídos pacientes com histórico de trauma, fratura coronária ou restauração na borda incisal dos dentes anteriores, fissuras no esmalte ou incisivos com rizogênese incompleta.

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram tratados com aparelho ortodôntico fixo, por meio de braquetes pré-ajustados convencionais, *slot* 22 x 28, Abzil- 3M do Brasil.

Nos grupos Asma e Controle, foram analisadas as seguintes variáveis: idade, gênero, tipo de má oclusão (Classe I ou II de Angle), características cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA), tempo de tratamento ortodôntico, severidade do apinhamento superior e inferior, trespasse horizontal, tipo de mecânica ortodôntica (exodontia, expansão rápida da maxila, uso de elásticos

intermaxilares) e uso de medicamentos para asma.

## **METODOLOGIA**

### **ANÁLISE RADIOGRÁFICA**

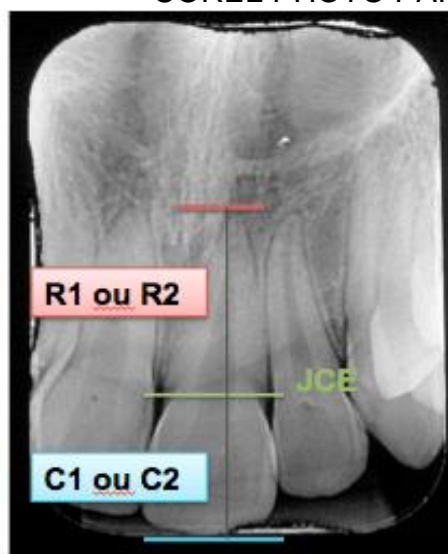
Para a análise radiográfica da reabsorção radicular, foram utilizadas radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores, realizadas antes e após 24 meses do início do tratamento ortodôntico.

Para padronização, todos os exames radiográficos foram realizados seguindo os mesmos parâmetros: técnica radiográfica do paralelismo, com posicionador autoclavável Universal (Jon-Jon), a uma distância foco/filme de 40 cm, filmes periapicais Kodak Dental Intraoral E-speed, tomadas radiográficas realizadas no aparelho de raios X Dabi Atlante (70 KV e 08 mA), tempo de exposição para os incisivos superiores e inferiores de 0,52 e 0,44 segundos, respectivamente. O método para o processamento dos filmes foi o tempo/temperatura.

Para verificar o grau e a magnitude da RRAE, as radiografias periapicais foram escaneadas com escaner próprio para radiografias (HP 4500), na proporção de 1:1, com resolução de 600 dpi. Essas imagens foram analisadas por meio do programa COREL PHOTO PAINT 12<sup>29</sup>, com resolução de 0,01 mm. Nas imagens, foram demarcados três pontos de referência: ápice radicular, borda incisal do dente e junção cimento-esmalte (JCE). O eixo longitudinal de cada dente foi demarcado a partir do ápice até a borda incisal, seguindo o canal radicular com a maior precisão possível. Em seguida, foi determinado o comprimento da coroa dos incisivos, medida entre a borda incisal e a JCE, e o comprimento da raiz, pela distância entre a JCE e o ápice radicular<sup>30</sup>. Previamente à avaliação da reabsorção dos incisivos, foi necessária a aplicação de um fator de correção (FC), uma vez que as imagens apresentam distorções entre as tomadas iniciais e àquelas realizadas ao longo do tratamento. Esse fator de correção consiste em um cálculo realizado com base na medida da coroa dentária, já que essa não sofre modificação durante o tratamento ortodôntico. Dessa forma, obtém-se o comprimento da coroa pré-tratamento (C1), o comprimento da coroa 24 meses após o início do tratamento

(C2) e o comprimento radicular inicial (R1). O comprimento radicular final (R2) foi obtido por uma regra de três. A quantidade de reabsorção foi obtida pelas fórmulas:  $FC=C1/C2$  e  $RRAE=R1-(R2 \times FC)^{30}$ . A quantificação da RRAE foi realizada por um único examinador, e as medidas foram atribuídas para cada incisivo, em milímetros (Figura 1). Para facilitar a análise dos dados, a quantidade de reabsorção radicular foi categorizada em dois grupos: RRAE até 2mm e RRAE maior que 2mm<sup>31</sup>.

Figura 1 – Quantificação da RRAE pelo Programa COREL PHOTO PAINT 12



Fonte: Do autor (2013).

#### ANÁLISE CEFALOMÉTRICA

Para a caracterização cefalométrica dos grupos, obtiveram-se cefalogramas em norma lateral obtidos a partir das telerradiografias no programa *Dolphin*, para a avaliação de 4 variáveis cefalométricas: SNA, SNB, ANB e FMA.

#### ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética da UNOPAR.



## COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

O DNA foi extraído a partir das células epiteliais da mucosa bucal dos pacientes envolvidos neste estudo, seguindo a metodologia descrita por Aidar e Line<sup>32</sup> (2007). Segundo este protocolo os pacientes bochecharam com 5mL de sacarose 3% por 60 segundos, esfregando a língua na mucosa bucal e nos dentes. Em seguida, o bochecho foi coletado em tubos de centrifuga de 15 mL e foram adicionados 3mL da solução **TNE** (17mM TRIS/HCl pH 8,0; 50mM NaCl; 7mM EDTA) diluído em 66% de etanol.

## EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

As células bucais coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Após essa etapa, foram ressuspendidas pela adição de 1 mL de **TNE** (17mM TRIS/HCl pH 8,0; 50mM NaCl; 7mM EDTA) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 1 mL da solução de lise (10mM TRIS pH 8,0; 0,5% SDS; 5mM EDTA; 10µL de proteinase K 20mg/mL), sendo a mistura levada ao vórtex por 5 segundos à velocidade média para posteriormente ser incubada em banho-Maria à 55°C *overnight*.

Após a incubação, 1 mL da mistura foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga de 2 mL e foram adicionados 500µL da solução Acetato de Amônio (8M) e EDTA (1mM). Misturou-se por 5 segundos e levou-se a centrifuga a 17000g por 10 minutos.

Decorrido o tempo necessário, transferiu-se 900 µL de sobrenadante para um outro tubo de microcentrifuga contendo 540 µL de isopropanol. Os tubos então foram invertidos 20 vezes e centrifugados por 5 minutos para que o sobrenadante possa ser descartado.

O DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 17000g por 5 minutos, sendo o etanol desprezado com cuidado. Cada tubo foi invertido e ficou secando sobre um papel absorvente. Transcorrido 1 hora, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de TE (10mM TRIS pH 7,8; 1mM EDTA).

Finalmente, o DNA extraído foi acondicionado a - 80°C para posterior utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR).

ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE DA INTERLEUCINA 1- $\beta$  (rs 1143634)

Para a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene da IL1- $\beta$  foram utilizados os seguintes iniciadores descritos por AL-QAWASMI et al.<sup>14</sup>:

a) Forward 5'- CTC AGG TGT TCC TCG AAG AAA TCA A-3'

b) Reverse 5'- GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG-3'

A mistura da PCR consistiu em um volume total de 50  $\mu$ L, contendo aproximadamente 100ng de DNA genômico, 1  $\mu$ M de solução tampão (1x), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M de cada primer, 200  $\mu$ M de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase. As soluções foram incubadas em um termociclador Multi-Gene.

As condições de amplificação foram de um ciclo a 95°C por dois minutos de desnaturação inicial e 38 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi constituído por: 1 minuto a 95°C (desnaturação), um minuto a 67°C (pareamento dos iniciadores), um minuto a 72°C (polimerização) e um ciclo a 72°C por oito minutos para a extensão final. O fragmento a ser amplificado tem 182 pb.

Após a amplificação, 5  $\mu$ L do produto da PCR foi analisado pela eletroforese em gel de agarose (1,0%). Posteriormente o gel foi corado com Sybr Safe (Invitrogen) e os fragmentos recém-sintetizados foram visualizados sob luz ultravioleta no aparelho LPIX-Locus. O tamanho do produto amplificado pela PCR foi estimado a partir da migração eletroforética do produto relativo ao marcador de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

Para a técnica de RFLP (polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição), 12 $\mu$ L do produto amplificado pela PCR foram adicionados a 13 $\mu$ L de solução, contendo 2,5 $\mu$ L de Tampão NE 10x, 0,2 $\mu$ L de TaqI (10.000U/mL) e 10,1  $\mu$ L de água deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 65°C *overnight*.

Os possíveis produtos resultantes da digestão foram dois fragmentos de 85 pb + 97 pb denominados de alelo 1 e um fragmento não digerido de 182pb denominado de alelo 2. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados por nitrato de prata.

Os indivíduos portadores de dois alelos 1 foram descritos como

homozigoto para o alelo 1 (homozigoto 1/1). Os indivíduos portadores de dois alelos 2 foram descritos como homozigoto para o alelo 2 (homozigoto 2/2). Já os heterozigotos foram descritos como  $\frac{1}{2}$ .

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A compatibilidade dos grupos quanto à proporção do gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica e uso de medicamentos para asma foi avaliada pelo teste do *Qui* Quadrado. Enquanto o teste *t* de Student independente foi utilizado para avaliar a semelhança dos grupos quanto à idade, características cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA), tempo de tratamento, severidade do apinhamento superior e inferior e trespasse horizontal.

Para acessar a confiabilidade dos métodos para a avaliação das variáveis cefalométricas e da RRAE, todas as medidas foram repetidas após 30 dias e os resultados foram avaliados por meio do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e da concordância de Bland & Altman, seguindo os critérios descritos por Fleiss<sup>33</sup>.

Para verificar a associação entre a presença de asma e a severidade da RRAE nos dois grupos, a partir da análise radiográfica, foi realizado o teste do Qui-quadrado. Nos dados obtidos após análise molecular, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequência genotípica e dos alelos. A Análise de Regressão Logística Simples foi utilizada para testar a associação entre a asma e a frequência genotípica.

A análise estatística foi realizada com os programas Bioestat 5.0, GraphPad Prism 5.0 e SPSS, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% para todos os testes utilizados.

## **RESULTADOS**

### **CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Os grupos asma e controle foram pareados quanto à idade ( $p=0,4463$ ), gênero ( $p=0,9555$ ), tipo de má oclusão ( $p=0,0553$ ), tipo de mecânica

ortodôntica (exodontia,  $p=0,6004$ ; expansão rápida da maxila (ERM),  $p=0,5517$ ; uso de elásticos intermaxilares,  $p=0,3915$ ), tempo de tratamento ( $p=0,1315$ ), severidade do apinhamento superior ( $p=0,1445$ ) e inferior ( $p=0,4002$ ), trespasse horizontal ( $p=0,1258$ ), características cefalométricas (SNA  $p=0,1584$ ; SNB  $p=0,2831$ ; ANB  $p=0,1232$ ; FMA  $p=0,4043$ ) e uso de medicamentos para asma ( $p=0,5101$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização da população do estudo quanto à idade, gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica (exodontia, ERM, uso de elásticos intermaxilares), tempo de tratamento, severidade do apinhamento superior e inferior, trespasse horizontal, características cefalométricas e uso de medicamentos para asma.

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>Controle</b>	<b>Asma</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos) *</b>			
Média/DP	18,8 (4,5)	20,4 (8,1)	0,4463
<b>Gênero **</b>			
Masculino	13 (61,9%)	13 (56,5%)	0,9555
Feminino	8 (38,1%)	10 (43,5%)	
<b>Má Oclusão **</b>			
Classe I	02 (9,5%)	9 (39,1%)	0,0553
Classe II	19 (90,5%)	14 (60,9%)	
<b>Exodontia **</b>			
SIM	6 (28,6%)	4 (17,4%)	0,6004
NÃO	15 (71,4%)	19 (82,6%)	
<b>Tempo de tratamento (meses) *</b>			
Média/DP	34,1 (14,4)	28,4 (9,8)	0,1315
<b>Apinhamento Superior (mm) *</b>			
Média/DP	2,3 (3,0)	1,2 (1,6)	0,1445
<b>Apinhamento Inferior (mm) *</b>			
Média/DP	2,3 (2,3)	1,7(2,2)	0,4002
<b>Trespasse Horizontal (mm) *</b>			
Média/DP	4,52 (2,4)	3,17 (3,2)	0,1258
<b>Características Cefalométricas *</b>			
SNA( $^{\circ}$ ) (Média/DP)	83,7 (3,6)	81,2 (4,0)	0,1584
SNB( $^{\circ}$ ) (Média/DP)	78,6 (4,1)	77,3(3,3)	0,2831
ANB( $^{\circ}$ ) (Média/DP)	5,1 (2,3)	3,8 (2,9)	0,1232
FMA( $^{\circ}$ ) (Média/DP)	24,3 (4,2)	25,5 (4,9)	0,4043
<b>ERM **</b>			
SIM	3 (14,2%)	6 (26,0%)	

NÃO	18 (85,8%)	17(74,0%)	0,5517
<b>Elástico intermaxilares **</b>			
SIM	13 (61,9%)	18 ( 78,2%)	
NÃO	8 ( 38,1%)	5 (21,8%)	0,3915
<b>Medicamento para asma **</b>			
SIM	0 (0%)	2 ( 8,7%)	
NÃO	21 (100%)	21 (91,3%)	0,5101

\* Teste t de *Student* independente

\*\* Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com correção de **Yates**

Fonte: Da autora.

#### ERRO DO MÉTODO

Os resultados demonstraram excelente concordância intraexaminador para as análises radiográfica e cefalométrica, com ICC variando entre 0,93 à 0,98. A Análise de *Bland & Altman* evidenciou resultados análogos, com um viés baixo para todas as variáveis e intervalos de confiança estreitos, o que representa boa replicabilidade das medidas obtidas<sup>33</sup> (Tabela 2).

**Tabela 2.** Confiabilidade do método para avaliação radiográfica da RRAE e das variáveis cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA): Média (M), desvio-padrão (DP), Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) e concordância de *Bland & Altman* (viés médio (VM), limite inferior (Lim Inf) e limite superior (Lim Sup)).

VARIÁVEIS	1ª. Medida		2ª. Medida		CCI	P	Erro	<i>Bland &amp; Altman</i>		
	Média	DP	Média	DP				Viés	Lim Sup	Lim Inf
RRAE(mm)	1,2	1,10	1,20	1,10	0,98	<0,0001*	0,003	0,001	0,179	-0,176
SNA(°)	82,4	4,02	82,7	3,99	0,93	<0,0001*	0,0002	0,295	2,517	-3,107
SNB(°)	77,9	3,73	78,0	3,75	0,93	<0,0001*	0,0002	0,118	2,534	-2,770
ANB(°)	4,4	2,70	4,7	2,65	0,96	<0,0001*	0,0206	0,304	1,620	-2,229
FMA(°)	24,9	4,60	25,1	4,9	0,93	<0,0001*	0,001	0,206	2,977	-3,390

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

## ANÁLISE RADIOGRÁFICA: COMPARAÇÃO DA REABSORÇÃO RADICULAR NOS PACIENTES ASMÁTICOS E NÃO ASMÁTICOS

Ao comparar a RRAE nos dois grupos, verificou-se que a presença de asma foi um fator decisivo para a presença de reabsorção radicular mais severa nos dentes avaliados ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 3). Esse mesmo padrão foi observado ao analisar separadamente a RRAE de incisivos superiores ( $p = 0,0003$ ) e inferiores ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Tabela 3 - Associação entre a severidade da RRAE nos incisivos superiores e inferiores e a presença de asma: teste do Qui-Quadrado.

	<b>Controle n (%)</b>	<b>Asma n (%)</b>
<b>RRAE até 2mm</b>	153 (92,1%)	125 (67,9%)
<b>RRAE &gt; 2mm</b>	13 (7,9%)	59 (32,1%)
<b>TOTAL</b>	166 (100%)	184 (100%)

$$\chi^2 = 31,366, *p < 0,0001$$

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

Tabela 4 - Associação entre a severidade da RRAE nos incisivos superiores e inferiores (separadamente) e a presença de asma: teste do Qui-Quadrado.

	<b>RRAE</b>	<b>Controle n (%)</b>	<b>Asma n (%)</b>
<b>Incisivos Superiores</b>	RRAE até 2mm	74 (88%)	58 (63%)
	RRAE > 2mm	10 (12%)	34 (37%)
	<b>Total</b>	84 (100%)	92 (100%)
$\chi^2 = 14,697, *p = 0,0003$			
<b>Incisivos Inferiores</b>	RRAE até 2mm	79 (94%)	67 (73%)
	RRAE > 2mm	03 (6%)	25 (27%)
	<b>Total</b>	84 (100%)	92 (100%)
$\chi^2 = 17,756, *p < 0,0001$			

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

## ANÁLISE MOLECULAR: COMPARAÇÃO DA REABSORÇÃO RADICULAR COM O GENE DA IL-1 $\beta$ NOS PACIENTES ASMÁTICOS E NÃO ASMÁTICOS

Considerando o estudo do polimorfismo de nucleotídeo único, a distribuição genotípica foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,0704$ ).

Em relação ao genótipo da IL-1 $\beta$ , os indivíduos são descritos de acordo com a ocorrência de reabsorção radicular, de forma categorizada, nos grupos

Asma e Controle (Tabela 5). A Eletroforese dos produtos do RFLP, ilustrando os genótipo 1/1, 2/2 e 1/2 decorrentes do polimorfismo no gene da Interleucina 1- $\beta$  são mostrados na figura 2.

No grupo Asma, a proporção de indivíduos com RRAE foi de 14,3% para o genótipo homocigoto 1/1 da IL-1 $\beta$  e 85,7% para aqueles que possuíam pelo menos um alelo do tipo 2 ( $\chi^2=4,537$ ,  $p=0,037$ ). No grupo controle, essa comparação não foi significativa ( $\chi^2= 2,625$ ,  $p=0,114$ ) (Tabela 5). Isto é, a RRAE estava mais presente no grupo Asma e relacionado ao alelo 2 do gene da IL-1 $\beta$ .

Com relação às frequências dos alelos do gene da IL-1 $\beta$ , o grupo Asma apresentou uma porcentagem maior de reabsorção radicular para os indivíduos portadores do alelo 2 (19,5%) em comparação ao alelo 1 (10,8%), ( $p=0,047$ ). Por outro lado, no grupo Controle, essa comparação não foi significativa ( $p=0,7424$ ) (Tabela 6).

A Análise de Regressão Logística Simples verificou que indivíduos asmáticos, portadores de pelo menos um alelo 2, apresentaram 1,3 vezes mais chances de desenvolver RRAE mais severa (OR=1,375; 95% IC: 1,077-1,758;  $p= 0,011$ ); e no grupo controle, 1,2 vezes mais chance (OR=1,250; 95% IC: 1,028-1,521;  $p= 0,026$ ) (Tabela 7).

Tabela 5 - Teste do Qui-quadrado para caracterizar os indivíduos quanto ao genótipo da IL 1- $\beta$  e a ocorrência de RRAE e nos grupos Asma e Controle.

<b>Grupo Asma</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>RRAE até 2mm</b>	<b>RRAE &gt; 2mm</b>
<b>Homozigoto 1/1</b>	10 (62,5%)	1 (14,3%)
<b>Homozigoto 2/2</b>	6 (37,5%)	6 (85,7% )
<b>Heterozigoto</b>		
<b>Total</b>	16 (100%)	7 (100%)
$\chi^2 = 4,537$ , * $p = 0,037$		

<b>Grupo Controle</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>RRAE até 2mm</b>	<b>RRAE &gt; 2mm</b>
<b>Homozigoto 1/1</b>	9 (50%)	0 (0%)
<b>Homozigoto 2/2</b>	9 (50%)	3 (100% )
<b>Heterozigoto</b>		
<b>Total</b>	18 (100%)	3 (100%)
$\chi^2 = 2,625$ , $p = 0,114$		

\*estatisticamente significativa ( $p<0,05$ )

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Teste do Qui-quadrado para distribuição dos alelos no gene da IL1- $\beta$  entre os grupos Asma e Controle.

<b>Grupo Asma</b>		
<b>Alelos</b>	<b>RRAE até 2mm n (%)</b>	<b>RRAE &gt; 2mm n (%)</b>
<b>Alelo 1</b>	24 (50%)	3 (10,8%)
<b>Alelo 2</b>	12 (19,5%)	3 (19,5%)

$\chi^2 = 5,347$ , \*p = 0,047

<b>Grupo Controle</b>		
<b>Alelos</b>	<b>RRAE até 2mm n (%)</b>	<b>RRAE &gt; 2mm n (%)</b>
<b>Alelo 1</b>	24 (57,1%)	3 (7,14%)
<b>Alelo 2</b>	12 (28,5%)	3 (7,14%)

$\chi^2 = 0,622$ , p = 0,7424

\* estatisticamente significante (p<0,05)

Fonte: Da autora.

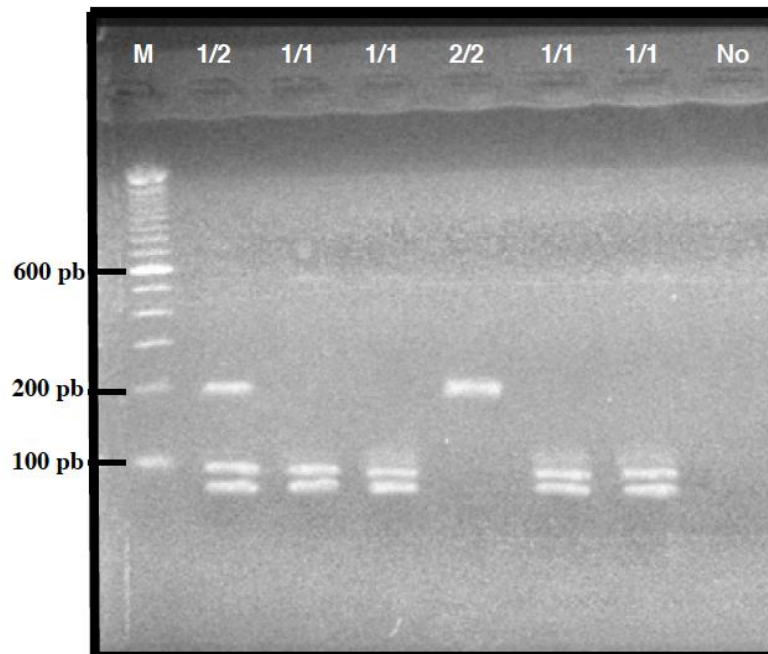
Tabela 7 - Modelo de Regressão Logística Simples para o gene da *IL 1- $\beta$*  entre os grupos Asma e Controle.

<b>Grupo Asma</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Homozigoto 1/1</b>	1	-
<b>Homozigoto 2/2</b>	1,375 (1,077-1,758)	0,011
<b>Heterozigoto</b>		
<b>Grupo Controle</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Homozigoto 1/1</b>	1	-
<b>Homozigoto 2/2</b>	1,250 (1,028-1,521)	0,026
<b>Heterozigoto</b>		

Fonte: Da autora.



Figura 2 – Eletroforese dos produtos do RFLP, ilustrando os genótipo 1/1, 2/2 e 1/2 decorrentes do polimorfismo no gene da Interleucina 1- $\beta$ . Os produtos resultantes da digestão foram denominados alelo1 (85pb e 97pb) e alelo 2 (182pb). No: controle negativo da PCR; M: marcador de peso molecular – 100pb DNA Ladder.



Fonte: Da autora (2013).

## DISCUSSÃO

Este trabalho investigou a influência do polimorfismo do gene da *IL-1 $\beta$*  na severidade da RRAE, em pacientes asmáticos, durante o tratamento ortodôntico.

Para tanto, os grupos Asma e Controle foram compatibilizados quanto à idade, gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica, tempo de tratamento, severidade do apinhamento, trespasse horizontal, características cefalométricas e uso de medicamentos para asma (Tabela 1). Isso porque esses fatores poderiam, de forma individual ou conjunta, contribuir para o aumento da severidade da RRAE<sup>13</sup>. Dessa forma, foi possível isolar a presença de asma como fator diferencial entre os dois grupos, permitindo a comparação proposta ao início do estudo.

Quanto à análise radiográfica, houve o cuidado em realizar radiografias periapicais padronizadas, que representam o método mais indicado para avaliação da RRAE<sup>12,34</sup>. Embora a radiografia panorâmica já tenha sido

utilizada em estudos prévios<sup>15,35</sup> para esta finalidade, sabe-se que este método pode superestimar os resultados em até 20% quando comparado à radiografia periapical<sup>34</sup>, o que comprometeria sobremaneira os resultados. Ainda com relação a esta análise, neste estudo optou-se por categorizar a RRAE em: 0 a 2mm e maior que 2mm. Isso porque existe uma dificuldade em quantificar com precisão reabsorções radiculares abaixo de 2mm<sup>31</sup> e considera-se que um arredondamento apical é esperado após a realização do tratamento ortodôntico<sup>5</sup>. Desta forma, o primeiro subgrupo (até 2mm) representou casos com RRAE clinicamente aceitável; enquanto a segunda categoria (>2mm) representou pacientes com RRAE mais severa, facilitando assim a avaliação dos dados.

A análise radiográfica deste estudo foi complementada pela investigação genética, que verificou a influência do polimorfismo do gene da *IL-1 $\beta$*  na severidade da RRAE, por meio de PCR-RFLP. A *IL-1 $\beta$*  é uma citocina potente na estimulação da atividade osteoclástica, que atrai leucócitos e outras células mediadoras no processo de remodelação óssea<sup>36</sup> e tem sido identificada como um importante biomarcador na movimentação ortodôntica<sup>37</sup>.

No presente estudo, utilizando radiografias periapicais, verificou-se maior severidade de RRAE nos incisivos de pacientes asmáticos durante o tratamento ortodôntico (Tabela 3). Ao avaliar de forma separada os dentes superiores e inferiores, esse padrão também foi mantido (Tabela 4). O presente trabalho corrobora com estudos prévios que já indicavam uma possível relação entre a RRAE e a asma<sup>23-26</sup>. Davidovitch et al.<sup>24</sup>, em uma revisão de literatura, apontaram a asma como uma possível condição favorável à produção de mediadores inflamatórios, que contribuiriam para o aumento do processo da reabsorção radicular. McNab et al.<sup>25</sup>, utilizando radiografias panorâmicas, observaram um aumento da incidência da reabsorção em dentes posteriores de pacientes asmáticos, comparados ao grupo saudável. Davidovitch et al.<sup>23</sup> verificaram que a incidência de asma, alergias e estresse foi significativamente maior em pacientes que sofreram reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico. Nishioka et al.<sup>26</sup>, também utilizando radiografias panorâmicas, observaram que a asma foi considerada um fator de alto risco, com quatro vezes mais chance para o desenvolvimento da RRAE na população estudada (OR=4,3), corroborando

o presente estudo.

Apesar de algumas evidências na literatura apontarem uma possível relação entre a RRAE e a asma<sup>23-26</sup>, nenhum estudo prévio investigou a influência de um marcador genético neste contexto. A interação entre fatores genéticos e estímulos ambientais na asma contribui para o desenvolvimento de uma resposta imune mediada, principalmente pela ativação de linfócitos T helper 2<sup>38</sup>, que induzem à produção de IgE, promovendo a eosinofilia e a inflamação das vias aéreas<sup>39,40</sup>. Uma vez liberados esses mediadores, observa-se broncoespasmo, congestão vascular e edema do tecido, além de aumentos generalizados na celularidade e na quantidade de capilares<sup>41</sup>. Assim como na asma, durante a movimentação ortodôntica, encontramos uma resposta inflamatória<sup>42</sup> no periodonto, caracterizado pelo aumento no calibre dos vasos do ligamento periodontal e mudanças estruturais nesse tecido<sup>43</sup>. O aumento da permeabilidade vascular e dos infiltrados inflamatórios diminui o pH e favorece a chegada de células clásticas<sup>41</sup>.

Na presente pesquisa, verificou-se associação entre o polimorfismo no gene da *IL-1β* com a RRAE, de acordo com os resultados prévios de outros autores<sup>14,16,17,44</sup>, embora estes estudos não tenham sido realizados em pacientes asmáticos. Além disso, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o genótipo ( $p=0,037$ ) (Tabela 5) e para a frequência alélica ( $p=0,047$ ) (Tabela 6) no grupo de pacientes asmáticos. Neste grupo, indivíduos portadores de pelo menos um alelo 2 apresentaram 1,3 vezes mais chances de desenvolver RRAE mais severa (OR=1,375; 95% IC: 1,077-1,758;  $p=0,011$ ). A associação da RRAE ao alelo 2, em indivíduos não asmáticos, também foi encontrado por Gulden et al.<sup>44</sup>, que apontaram uma frequência maior do alelo 1 no grupo controle. No estudo de Iglesias-Linares<sup>45</sup> também foram observados esses resultados, embora em dentes tratados endodonticamente. Por outro lado, alguns autores<sup>14,16,17</sup> encontraram associação da RRAE com o genótipo homocigoto 1/1 da *IL-1β*. No presente estudo, o efeito deletério observado especificamente para o alelo 2, pode ser resultado de um sinergismo entre os mediadores inflamatórios presentes na asma e na movimentação ortodôntica. Isso porque, já é conhecido que o alelo 2 é responsável por aumentar 4 vezes a produção *IL-1β*<sup>14,46</sup> e esta condição, associada ao caráter inflamatório da asma, provocaria um aumento significativo de células clásticas na região, o que

favoreceria a maior severidade da RRAE em pacientes asmáticos.

Considerando a asma um problema mundial de saúde pública<sup>28</sup>, esses resultados podem contribuir para a prevenção de respostas indesejáveis durante o tratamento ortodôntico e para a implementação de medidas preventivas no controle da RRAE em pacientes asmáticos.

## CONCLUSÃO

O polimorfismo do gene da *IL-1β* está associado à presença de maior severidade de RRAE em pacientes asmáticos. Ainda, os resultados descritos no presente estudo sugerem que indivíduos portadores do alelo 2 do gene da *IL-1β* pode predispor à RRAE, durante o tratamento ortodôntico nesses pacientes.

## REFERENCIAS

1. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1993 Feb;103(2):138-46.
2. Brin I, Bollen AM. External apical root resorption in patients treated by serial extractions followed by mechanotherapy. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011 Feb;139(2):e129-34.
3. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1997 Mar;111(3):301-9.
4. Ren H, Chen J, Deng F, Zheng L, Liu X, Dong Y. Comparison of cone-beam computed tomography and periapical radiography for detecting simulated apical root resorption. Angle Orthod. 2013 Mar;83(2):189-95.
5. Kurol J, Owman-Moll P, Lundgren D. Time-related root resorption after application of a controlled continuous orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1996 Sep;110(3):303-10.
6. Castro IO, Alencar AH, Valladares-Neto J, Estrela C. Apical root resorption due to orthodontic treatment detected by cone beam computed tomography. Angle Orthod. 2013 Mar;83(2):196-203.
7. Killiany DM. Root resorption caused by orthodontic treatment: an evidence-based review of literature. Semin Orthod. 1999 Jun;5(2):128-33.
8. Taithongchai R, Sookkorn K, Killiany DM. Facial and dentoalveolar

structure and the prediction of apical root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Sep;110(3):296-302.

9. Abass SK, Hartsfield JK, Jr., Al-Qawasmi RA, Everett ET, Foroud TM, Roberts WE. Inheritance of susceptibility to root resorption associated with orthodontic force in mice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008 Dec;134(6):742-50.

10. Artun J, Smale I, Behbehani F, Doppel D, Van't Hof M, Kuijpers-Jagtman AM. Apical root resorption six and 12 months after initiation of fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthod.* 2005 Nov;75(6):919-26.

11. Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Al-Qawasmi RA. Genetic Factors in External Apical Root Resorption and Orthodontic Treatment. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(2):115-22.

12. Sherrard JF, Rossouw PE, Benson BW, Carrillo R, Buschang PH. Accuracy and reliability of tooth and root lengths measured on cone-beam computed tomographs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010 Apr;137(4 Suppl):S100-8.

13. Weltman B, Vig KW, Fields HW, Shanker S, Kaizar EE. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* Apr;137(4):462-76; discussion 12A.

14. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Mar;123(3):242-52.

15. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Faust DM, et al. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. *Eur J Orthod.* 2006 Feb;28(1):13-9.

16. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJ, Gontijo AI, et al. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Oct;136(4):542-6.

17. SilvaFilho JM. Relação entre o polimorfismo no gene IL-1 $\beta$  e a reabsorção apical externa em dentes tratados ortodonticamente. Londrina: UNOPAR; 2008.

18. Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod.* 1975 May;67(5):522-39.

19. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Feb;125(2):168-77.

20. Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration

in rats. *Eur J Orthod.* 2005 Jun;27(3):215-25.

21. Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C, Jaeger A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodontal Res.* 2003 Jun;38(3):324-32.

22. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Mar;12(1):9-18.

23. Davidovitch ZeE, Mah JE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 2000.

24. Davidovitch ZeE, Norton LAE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 1996.

25. McNab S, Battistutta D, Taverne A, Symons AL. External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999 Nov;116(5):545-51.

26. Nishioka M, Ioi H, Nakata S, Nakasima A, Counts A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. *Angle Orthod.* 2006 Jan;76(1):103-8.

27. Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T, Openshaw P, Johnston SL. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Jul;10(7):459-71.

28. Boon NC, NR; Walker, BR; Hunter, JA. Davidson's Principles and Practice of Medicine. Elsevier, editor.: Elsevier; 2006.

29. Esteves T, Ramos AL, Pereira CM, Hidalgo MM. Orthodontic root resorption of endodontically treated teeth. *J Endod.* 2007 Feb;33(2):119-22.

30. Mohandesan H, Ravanmehr H, Valaei N. A radiographic analysis of external apical root resorption of maxillary incisors during active orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 2007 Apr;29(2):134-9.

31. Linge BO, Linge L. Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod.* 1983 Aug;5(3):173-83.

32. 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.

33. Fleiss JL. Confidence intervals vs significance tests: quantitative interpretation. *Am J Public Health.* 1986 May;76(5):587-8.

34. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 May;119(5):505-10.

35. Dudic A, Giannopoulou C, Leuzinger M, Kiliaridis S. Detection of apical

root resorption after orthodontic treatment by using panoramic radiography and cone-beam computed tomography of super-high resolution. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Apr;135(4):434-7.

36. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994 May;65(5):423-8.

37. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996 Jan;75(1):562-7.

38. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* 2002;53:477-98.

39. Kay AB. Eosinophils and asthma. *N Engl J Med.* 1991 May 23;324(21):1514-5.

40. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):838-48.

41. Machado CC, Nojima Mda C, Rodrigues e Silva PM, Mandarim-de-Lacerda CA. Histomorphometric study of the periodontal ligament in the initial period of orthodontic movement in Wistar rats with induced allergic asthma. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Sep;142(3):333-8.

42. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res.* 2010 Oct;89(10):1135-41.

43. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1967 Oct;53(10):721-45.

44. Gulden N, Eggermann T, Zerres K, Beer M, Meinelt A, Diedrich P. Interleukin-1 polymorphisms in relation to external apical root resorption (EARR). *J Orofac Orthop.* 2009 Jan;70(1):20-38.

45. Iglesias-Linares A, Yanez-Vico RM, Ortiz-Ariza E, Ballesta S, Mendoza-Mendoza A, Perea E, et al. Postorthodontic external root resorption in root-filled teeth is influenced by interleukin-1beta polymorphism. *J Endod.* 2012 Mar;38(3):283-7.

46. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest.* 1992 Jun;22(6):396-402.

## 5 ARTIGO 2

### A ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO ( rs 731236) DO GENE RECEPTOR DA VITAMINA D (VDR) COM A REABSORÇÃO RADICULAR APICAL EXTERNA EM PACIENTES ASMÁTICOS TRATADOS ORTODONTICAMENTE

#### RESUMO

**Introdução:** Estudos recentes demonstraram uma associação entre o polimorfismo *TaqI* no gene receptor da vitamina D (VDR) com a reabsorção radicular apical externa (RRAE) na movimentação ortodôntica. A RRAE também tem sido relacionada aos pacientes asmáticos, uma vez que mediadores inflamatórios dessa patologia podem atuar sinergicamente nesse processo. **Objetivo:** determinar se pacientes asmáticos, sob tratamento ortodôntico, apresentam maior severidade da RRAE em dentes anteriores, quando correlacionados ao polimorfismo do gene VDR. **Material e métodos:** A amostra foi composta por 44 pacientes, de ambos os gêneros, com média de idade de 16 anos ( $\pm 6,4$ ), divididos em 2 grupos: Asma (n=23) e Controle (n=21). Para tanto, foram realizadas duas análises: radiográfica, por meio da avaliação de radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores, realizadas antes e 24 meses após o início do tratamento; molecular, extração do DNA a partir de células epiteliais da mucosa bucal dos pacientes e a análise do polimorfismo no gene VDR (PCR em tempo real). O tratamento estatístico foi realizado a partir dos testes t independente, Qui-Quadrado, Análise de Regressão Logística Simples, Coeficiente de Correlação Intraclasse e concordância de Bland & Altman (significância 5%). **Resultados:** Verificou-se que o grupo Asma apresentou maior severidade de RRAE em relação ao grupo Controle ( $p < 0,0001$ ). Além disso, observou-se que indivíduos heterozigotos apresentaram 1,8 mais chance de desenvolver RRAE mais severa (OR= 1,868; 95% IC = 1,336 – 2,613;  $p = 0,0001$ ) em pacientes asmáticos. Com base nos resultados, conclui-se que o polimorfismo no gene VDR esteve associado à RRAE em pacientes asmáticos tratados ortodonticamente.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Asma. Reabsorção dentária. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Receptor de vitamina D.

#### INTRODUÇÃO

A asma brônquica caracteriza-se como uma inflamação crônica das vias aéreas inferiores, levando a episódios de obstrução parcial do fluxo aéreo, reversíveis espontaneamente ou com terapia medicamentosa<sup>1</sup>. Sua prevalência está em torno de 1 a 8% na população mundial<sup>2</sup>. Contudo, esta doença tem apresentado um aumento significativo em sua incidência nos



últimos anos, tornando-se um problema crescente de saúde pública, com mais de 300 milhões de portadores em todo mundo<sup>2</sup>.

A inflamação na asma é regulada mutuamente por uma série de citocinas e elementos inflamatórios, que podem ser determinados por fatores genéticos e ambientais<sup>3</sup>. Essa interação entre fatores genéticos e estímulos ambientais contribui para o desenvolvimento de uma resposta imune mediada, principalmente pela ativação de linfócitos T helper 2<sup>4</sup>, aumento dos níveis de IgE e inflamação das vias aéreas<sup>5,6</sup>. Uma vez liberados esses mediadores inflamatórios, observa-se broncoespasmo, congestão vascular e edema do tecido, além do aumento na quantidade de células e capilares<sup>7</sup>.

Assim como na asma, durante a movimentação ortodôntica encontra-se uma resposta inflamatória<sup>8</sup> no periodonto, caracterizada pelo aumento no calibre dos vasos do ligamento periodontal e mudanças estruturais nesse tecido<sup>9</sup>. O aumento da permeabilidade vascular e dos infiltrados inflamatórios reduz o pH e favorece o recrutamento de células clásticas<sup>7</sup>. Por isso, a possível relação entre a reabsorção radicular ortodôntica e a asma já foi investigada por alguns autores<sup>10-13</sup>.

O conhecimento do genoma humano identificou a região 12q13-23, que abriga o gene receptor da vitamina D (VDR)<sup>14</sup>. O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição<sup>15</sup> e está expresso em diferentes células como osteoblastos<sup>16</sup>, linfócitos, macrófagos e células B pancreáticas<sup>17</sup>. Além dos níveis séricos, a vitamina D depende da presença desses receptores (VDR) para seu correto funcionamento<sup>15</sup>.

Dados epidemiológicos confirmaram a associação entre o polimorfismo no gene VDR e o desenvolvimento da asma<sup>18,19</sup>. Pacientes asmáticos apresentam menores níveis de vitamina D<sup>20</sup>, além do aumento no número de hospitalizações pela exacerbação da doença<sup>21</sup>.

Recentemente, verificou-se também associação entre o polimorfismo no gene VDR e a reabsorção radicular apical externa (RRAE) durante o tratamento ortodôntico<sup>22</sup>. Os autores observaram que indivíduos tratados ortodonticamente e que apresentam o genótipo contendo o alelo "C", no polimorfismo do gene VDR, foram fracamente associados à proteção da RRAE (OR=0,29; 95% IC: 0,07-1,23; p= 0,091), comparados àqueles sem tratamento.

Desta forma, um estudo mais aprofundado sobre o polimorfismo desse

gene e sua associação com a RRAE, em pacientes asmáticos, parece ser de grande relevância na prevenção de respostas indesejáveis durante o tratamento ortodôntico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) (Pt / 276648) (Anexo 1). Todos os indivíduos incluídos no estudo, ou seus responsáveis legais, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

### **AMOSTRA**

A amostra foi composta por 44 pacientes, de ambos os gêneros, provenientes do curso de mestrado em Ortodontia, da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR). A amostra foi dividida em 2 grupos: Asma (n=23, média de idade:  $20,4 \pm 8,1$  anos), pacientes portadores de asma brônquica; Controle (n=21, média de idade:  $18,8 \pm 4,5$  anos), pacientes não portadores de asma brônquica. Os pacientes asmáticos foram provenientes do Ambulatório de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, no qual receberam diagnóstico da asma por um pneumologista.

Para serem incluídos no estudo, os pacientes não poderiam ter sido submetidos a tratamento ortodôntico prévio. Ainda, foram excluídos pacientes com histórico de trauma, fratura coronária ou restauração na borda incisal dos dentes anteriores, fissuras no esmalte ou incisivos com rizogênese incompleta.

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram tratados com aparelho ortodôntico fixo, por meio de braquetes pré-ajustados convencionais, *slot* 22, Abzil - 3M do Brasil.

Nos grupos Asma e Controle, foram analisadas as seguintes variáveis: idade, gênero, tipo de má oclusão (Classe I ou II de Angle), características cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA), tempo de tratamento ortodôntico, severidade do apinhamento superior e inferior, trespasse horizontal, tipo de mecânica ortodôntica (exodontia, expansão rápida da maxila (ERM), uso de elásticos intermaxilares) e uso de medicamentos para asma.

## METODOLOGIA

### ANÁLISE RADIOGRÁFICA

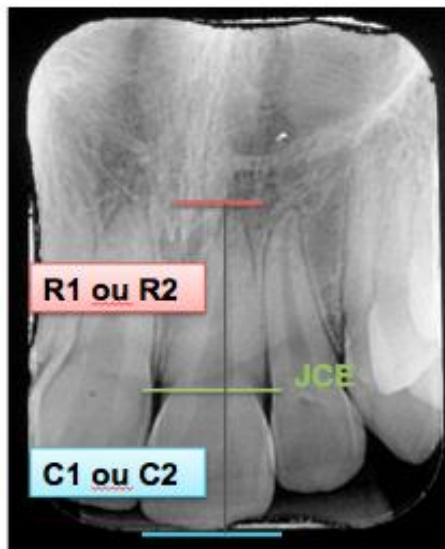
Para a análise radiográfica da reabsorção radicular, foram utilizadas radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores, realizadas antes e após 24 meses do início do tratamento ortodôntico.

Para padronização, todos os exames radiográficos foram realizados seguindo os mesmos parâmetros: técnica radiográfica do paralelismo, com posicionador autoclavável Universal (Jon-Jon), a uma distância foco/filme de 40 cm, filmes periapicais Kodak Dental Intraoral E-speed, tomadas radiográficas realizadas no aparelho de raios X Dabi Atlante (70 KV e 08 mA), tempo de exposição para os incisivos superiores e inferiores de 0,52 e 0,44 segundos, respectivamente. O método para o processamento dos filmes foi o tempo/temperatura.

Para verificar o grau e a magnitude da RRAE, as radiografias periapicais foram escaneadas com escaner próprio para radiografias (HP 4500), na proporção de 1:1, com resolução de 600 dpi. Essas imagens foram analisadas por meio do programa COREL PHOTO PAINT 12<sup>23</sup>, com resolução de 0,01 mm. Nas imagens, foram demarcados três pontos de referência: ápice radicular, borda incisal do dente e junção cimento-esmalte (JCE). O eixo longitudinal de cada dente foi demarcado a partir do ápice até a borda incisal, seguindo o canal radicular com a maior precisão possível. Em seguida, foi determinado o comprimento da coroa dos incisivos, medida entre a borda incisal e a JCE, e o comprimento da raiz, pela distância entre a JCE e o ápice radicular<sup>24</sup>. Previamente à avaliação da reabsorção dos incisivos, foi necessária a aplicação de um fator de correção (FC), uma vez que as imagens apresentam distorções entre as tomadas iniciais e àquelas realizadas ao longo do tratamento. Esse fator de correção consiste em um cálculo realizado com base na medida da coroa dentária, já que essa não sofre modificação durante o tratamento ortodôntico. Dessa forma, obtém-se o comprimento da coroa pré-tratamento (C1), o comprimento da coroa 24 meses após o início do tratamento (C2) e o comprimento radicular inicial (R1). O comprimento radicular final (R2) foi obtido por uma regra de três. A quantidade de reabsorção foi obtida pelas

fórmulas:  $FC=C1/C2$  e  $RRAE=R1-(R2 \times FC)^{24}$ . A quantificação da RRAE foi realizada por um único examinador, e as medidas foram atribuídas para cada incisivo, em milímetros (Figura 1). Para facilitar a análise dos dados, a quantidade de reabsorção radicular foi categorizada em dois grupos: RRAE até 2mm e RRAE maior que 2mm<sup>25</sup>.

Figura 1 – Quantificação da RRAE pelo Programa COREL PHOTO PAINT 12



Fonte: Da autora.

#### ANÁLISE CEFALOMÉTRICA

Para a caracterização cefalométrica dos grupos, obtiveram-se cefalogramas em norma lateral obtidos a partir das telerradiografias no programa *Dolphin*, para a avaliação de 4 variáveis cefalométricas: SNA, SNB, ANB e FMA.

#### ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Genética da UNOPAR.

#### COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

O DNA foi extraído a partir das células epiteliais da mucosa bucal dos pacientes envolvidos neste estudo, seguindo a metodologia descrita por Aidar e Line<sup>26</sup> (2007). Segundo este protocolo os pacientes bochecharam com 5mL de sacarose 3% por 60 segundos, esfregando a língua na mucosa bucal e nos dentes. Em seguida, o bochecho foi coletado em tubos de centrífuga de 15 mL e foram adicionados 3mL da solução **TNE** (17mM TRIS/HCl pH 8,0; 50mM NaCl; 7mM EDTA) diluído em 66% de etanol.

#### EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DAS CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

As células bucais coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Após essa etapa, foram ressuspensas pela adição de 1 mL de TNE (17mM TRIS/HCl pH 8,0; 50mM NaCl; 7mM EDTA) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 1 mL da solução de lise (10mM TRIS pH 8,0; 0,5% SDS; 5mM EDTA; 10µL de proteinase K 20mg/mL), sendo a mistura levada ao vórtex por 5 segundos à velocidade média para posteriormente ser incubada em banho-Maria à 55°C *overnight*.

Após a incubação, 1 mL da mistura foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 2 mL e foram adicionados 500µL da solução Acetato de Amônio (8M) e EDTA (1mM). Misturou-se por 5 segundos e levou-se a centrífuga a 17000g por 10 minutos.

Decorrido o tempo necessário, transferiu-se 900 µL de sobrenadante para um outro tubo de microcentrífuga contendo 540 µL de isopropanol. Os tubos então foram invertidos 20 vezes e centrifugados por 5 minutos para que o sobrenadante possa ser descartado.

O DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 17000g por 5 minutos, sendo o etanol desprezado com cuidado. Cada tubo foi invertido e ficou secando sobre um papel absorvente. Transcorrido 1 hora, o DNA foi ressuspensado em 100 µL de TE (10mM TRIS pH 7,8; 1mM EDTA).

Finalmente, o DNA extraído foi acondicionado a - 80°C para posterior utilização na reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando o sistema Taqman para detecção do polimorfismo de base única (SNP).

Análise Do Polimorfismo No Gene Do Receptor De Vitamina D (VDR) (rs 731236).

Para análise do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene VDR foi realizada a técnica de amplificação dos fragmentos de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) pelo sistema *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, USA). O polimorfismo avaliado foi o *TaqI I*, com um par de primer e sonda alelo específica, confeccionado pela Applied Biontens, e o uso de marcadores VIC e FAM.

A reação padronizada utilizada continha 20µL de volume final, sendo 10µl de *Taqman*<sup>®</sup> *Genotyping Master Mix* (1x), 0,5µL de sonda (1x) (Applied Biosystems, Foster City, USA), 7,5µL de água ultrapura *Milli-Q*<sup>®</sup> e 2µL de DNA (30ng/µL). Foi utilizado o termociclador StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) com a seguinte ciclagem: 60°C por 30 segundos (pré desnaturação), 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial, 50 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto e 30 segundos (pareamento dos iniciadores) e um ciclo final de extensão de 30 segundos a 60°C. A avaliação dos resultados foi realizada pelo StepOne Software v2.3.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A compatibilidade dos grupos quanto à proporção do gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica e uso de medicamentos para asma foi avaliada pelo teste do *Qui Quadrado*. Enquanto o teste *t de Student* independente foi utilizado para avaliar a semelhança dos grupos quanto à idade, características cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA), tempo de tratamento, severidade do apinhamento superior e inferior e trespasse horizontal.

Para acessar a confiabilidade dos métodos para a avaliação das variáveis cefalométricas e da RRAE, todas as medidas foram repetidas após 30 dias e os resultados foram avaliados por meio do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e da concordância de Bland & Altman, seguindo os critérios descritos por Fleiss<sup>27</sup>.

Para verificar a associação entre a presença de asma e a severidade da RRAE nos dois grupos, a partir da análise radiográfica, foi realizado o teste do Qui-quadrado. Nos dados obtidos após análise molecular, utilizou-se o teste do Qui-Quadrado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequência genotípica e dos alelos. A análise de Regressão Logística Simples foi utilizada para testar a associação entre a asma e a frequência genotípica.

A análise estatística foi realizada com os programas Bioestat 5.0, GraphPad Prism 5.0 e SPSS, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% para todos os testes utilizados.

## **RESULTADOS**

### CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os grupos asma e controle foram pareados quanto à idade ( $p=0,4463$ ), gênero ( $p=0,9555$ ), tipo de má oclusão ( $p=0,0553$ ), tipo de mecânica ortodôntica (exodontia,  $p=0,6004$ ; expansão rápida da maxila (ERM),  $p=0,5517$ ; uso de elásticos intermaxilares,  $p=0,3915$ ), tempo de tratamento ( $p=0,1315$ ), severidade do apinhamento superior ( $p=0,1445$ ) e inferior ( $p=0,4002$ ), trespasse horizontal ( $p=0,1258$ ), características cefalométricas (SNA  $p=0,1584$ ; SNB  $p=0,2831$ ; ANB  $p=0,1232$ ; FMA  $p=0,4043$ ) e uso de medicamentos para asma ( $p=0,5101$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização da população do estudo quanto à idade, gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica (exodontia, ERM, uso de elásticos intermaxilares), tempo de tratamento, severidade do apinhamento superior e inferior, trespasse horizontal, características cefalométricas e uso de medicamentos para asma.

<b>VARIÁVEIS</b>	<b>Controle</b>	<b>Asma</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos) *</b>			
Média/DP	18,8 (4,5)	20,4 (8,1)	0,4463
<b>Gênero **</b>			
Masculino	13 (61,9%)	13 (56,5%)	0,9555
Feminino	8 (38,1%)	10 (43,5%)	
<b>Má Oclusão **</b>			
Classe I	02 (9,5%)	9 (39,1%)	0,0553
Classe II	19 (90,5%)	14 (60,9%)	
<b>Exodontia **</b>			
SIM	6 (28,6%)	4 (17,4%)	0,6004
NÃO	15 (71,4%)	19 (82,6%)	
<b>Tempo de tratamento (meses) *</b>			
Média/DP	34,1 (14,4)	28,4 (9,8)	0,1315
<b>Apinhamento Superior (mm) *</b>			
Média/DP	2,3 (3,0)	1,2 (1,6)	0,1445
<b>Apinhamento Inferior (mm) *</b>			
Média/DP	2,3 (2,3)	1,7(2,2)	0,4002
<b>Trespasse Horizontal (mm) *</b>			
Média/DP	4,52 (2,4)	3,17 (3,2)	0,1258
<b>Características Cefalométricas *</b>			
SNA(°) (Média/DP)	83,7 (3,6)	81,2 (4,0)	0,1584
SNB(°) (Média/DP)	78,6 (4,1)	77,3(3,3)	0,2831
ANB(°) (Média/DP)	5,1 (2,3)	3,8 (2,9)	0,1232
FMA(°) (Média/DP)	24,3 (4,2)	25,5 (4,9)	0,4043
<b>ERM **</b>			
SIM	3 (14,2%)	6 (26,0%)	0,5517
NÃO	18 (85,8%)	17(74,0%)	
<b>Elásticos Intermaxilares **</b>			
SIM	13 (61,9%)	18 ( 78,2%)	0,3915
NÃO	8 ( 38,1%)	5 (21,8%)	
<b>Medicamento para asma **</b>			
SIM	0 (0%)	2 ( 8,7%)	0,5101
NÃO	21 (100%)	21 (91,3%)	

\* Teste t de *Student* independente

\*\* Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com correção de **Yates**

Fonte: Da autora.

## ERRO DO MÉTODO

Os resultados demonstraram excelente concordância intraexaminador para as análises radiográfica e cefalométrica, com ICC variando entre 0,93 à 0,98. A Análise de *Bland & Altman* evidenciou resultados análogos, com um



viés baixo para todas as variáveis e intervalos de confiança estreitos, o que representa boa replicabilidade das medidas obtidas<sup>27</sup> (Tabela 2).

Tabela 2. Confiabilidade do método para avaliação radiográfica da RRAE e das variáveis cefalométricas (SNA, SNB, ANB e FMA): Média (M), desvio-padrão (DP), Coeficiente de correlação intraclasse (CCI) e concordância de *Bland & Altman* (viés médio (VM), limite inferior (Lim Inf) e limite superior (Lim Sup)).

VARIÁVEIS	1ª. Medida		2ª. Medida		CCI			Bland & Altman		
	Média	DP	Média	DP	CCI	P	Erro	Viés	Lim Sup	Lim Inf
RRAE(mm)	1,2	1,10	1,20	1,10	0,98	<0,0001*	0,003	0,001	0,179	-0,176
SNA(°)	82,4	4,02	82,7	3,99	0,93	<0,0001*	0,0002	0,295	2,517	-3,107
SNB(°)	77,9	3,73	78,0	3,75	0,93	<0,0001*	0,0002	0,118	2,534	-2,770
ANB(°)	4,4	2,70	4,7	2,65	0,96	<0,0001*	0,0206	0,304	1,620	-2,229
FMA(°)	24,9	4,60	25,1	4,9	0,93	<0,0001*	0,001	0,206	2,977	-3,390

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

#### ANÁLISE RADIOGRÁFICA: COMPARAÇÃO DA REABSORÇÃO RADICULAR NOS PACIENTES ASMÁTICOS E NÃO ASMÁTICOS

Ao comparar a RRAE nos dois grupos, verificou-se que a presença de asma foi um fator decisivo para a presença de reabsorção radicular mais severa nos dentes avaliados ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 3). Esse mesmo padrão foi observado ao analisar separadamente a RRAE de incisivos superiores ( $p = 0,0003$ ) e inferiores ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Tabela 3. Associação entre a severidade da RRAE nos incisivos superiores e inferiores e a presença de asma: teste do Qui-Quadrado.

	Controle n (%)	Asma n (%)
RRAE até 2mm	153 (92,1%)	125 (67,9%)
RRAE > 2mm	13 (7,9%)	59 (32,1%)
TOTAL	166 (100%)	184 (100%)

$\chi^2 = 31,366$ ; \* $p < 0,0001$

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

Tabela 4. Associação entre a severidade da RRAE nos incisivos superiores e inferiores (separadamente) e a presença de asma: teste do Qui-Quadrado.

	RRAE	Controle n (%)	Asma n (%)
<b>Incisivos Superiores</b>	RRAE até 2mm	74 (88%)	58 (63%)
	RRAE > 2mm	10 (12%)	34 (37%)
	Total	84 (100%)	92 (100%)
$\chi^2 = 14,697$ ; * $p = 0,0003$			
<b>Incisivos Inferiores</b>	RRAE até 2mm	79 (94%)	67 (73%)
	RRAE > 2mm	03 (6%)	25 (27%)
	Total	84 (100%)	92 (100%)
$\chi^2 = 17,756$ ; * $p < 0,0001$			

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

#### ANÁLISE MOLECULAR: COMPARAÇÃO DA REABSORÇÃO RADICULAR COM O GENE VDR NOS PACIENTES ASMÁTICOS E NÃO ASMÁTICOS

Considerando o estudo do polimorfismo de nucleotídeo único, a distribuição genotípica foi consistente com o equilíbrio de Hardy–Weinberg ( $p = 0,2354$ ).

Observou-se associação significativa entre o polimorfismo rs 731236 (*TaqI*) no gene receptor da vitamina D com a frequência genotípica e a RRAE apenas no grupo de pacientes asmáticos ( $p = 0,012$ ) (Tabela 5). Os indivíduos portadores do genótipo C/C (Figura 2) não apresentaram associação com a RRAE no grupo da asma. Em contrapartida, 28,6% apresentaram RRAE quando eram portadores do genótipo T/T (Figura 3) e 71,4% quando eram heterozigotos (Figura 4) ( $\chi^2 = 6,797$ ;  $p = 0,012$ ) (Tabela 5).

Ao contrário dos resultados encontrados para a frequência genotípica, não foi observada associação significativa dos alelos desse receptor com a RRAE tanto no grupo asma quanto no controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

Após análise de Regressão Logística Simples, verificou-se que indivíduos asmáticos e portadores do genótipo heterozigoto apresentaram 1,8 vezes mais chances de desenvolver RRAE mais severa (>2mm) após o tratamento ortodôntico (OR= 1,868; 95% IC=1,336-2,613;  $p = 0,0001$ ) (Tabela 7).

Tabela 5. Distribuição genotípica no polimorfismo *TaqI* no gene receptor da vitamina D (VDR) entre os grupos Asma e Controle.

<b>Grupo Asma</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>RRAE até 2mm</b>	<b>RRAE &gt; 2mm</b>
<b>Homozigoto C/C</b>	6 (37,5%)	0 (0%)
<b>Homozigoto T/T</b>	7 (43,8%)	2 (28,6%)
<b>Heterozigoto C/T</b>	3 (18,8%)	5 (71,4%)
$\chi^2 = 6,797$ ; * $p=0,012$		
<b>Grupo Controle</b>		
<b>Genótipo</b>	<b>RRAE até 2mm</b>	<b>RRAE &gt; 2mm</b>
<b>Homozigoto C/C</b>	3 (16,7%)	0 (0%)
<b>Homozigoto T/T</b>	8 (4,4%)	0 (0%)
<b>Heterozigoto C/T</b>	7 (38,9%)	2 (100%)
$\chi^2 = 2,716$ ; $p=0,154$		

\* Estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Fonte: Da autora.

Tabela 6. Distribuição dos alelos no polimorfismo *TaqI* no gene receptor da vitamina D (VDR) entre os grupos Asma e Controle.

<b>Grupo Asma</b>		
<b>Alelos</b>	<b>RRAE até 2mm n (%)</b>	<b>RRAE &gt; 2mm n (%)</b>
<b>Alelo C</b>	15 (32,6%)	5 (10,8%)
<b>Alelo T</b>	17 (36,9%)	9 (19,5%)
$\chi^2 = 0,494$ ; $p=0,7044$		
<b>Grupo Controle</b>		
<b>Alelos</b>	<b>RRAE até 2mm n (%)</b>	<b>RRAE &gt; 2mm n (%)</b>
<b>Alelo C</b>	13 (32,5%)	2 (5%)
<b>Alelo T</b>	23 (57,5%)	2 (5%)
$\chi^2 = 0,296$ ; $p=1,0000$		

Fonte: Da autora.

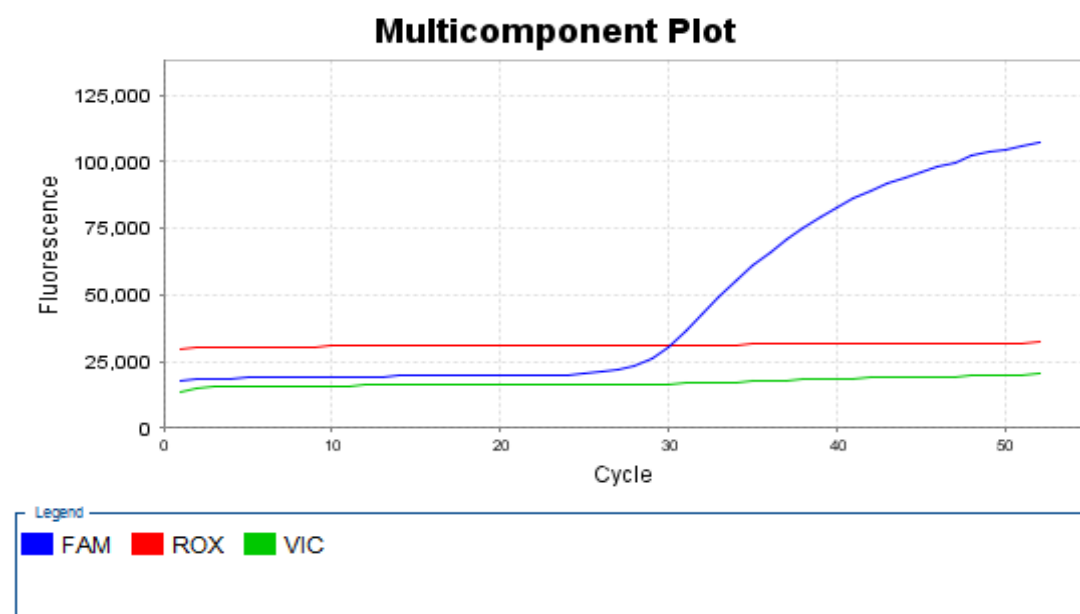
Tabela 7. Modelo de Regressão Logística Simples no polimorfismo *TaqI* no gene receptor da vitamina D (VDR) entre os genótipos dos grupos Asma e Controle.

Grupo Asma		
Genótipo	OR (95% CI)	p
Genótipo C/C	1	
Genótipo T/T	1,249 (0,952 – 1,639)	0,109
Heterozigoto C/T	1,868 (1,336 – 2,613)	0,0001*
Grupo Controle		
Genótipo	OR (95% CI)	p
Genótipo C/C	1	
Genótipo T/T	1,000 (1,00 – 1,00)	P > 0,05
Heterozigoto	1,249 (0,952 – 1,639)	0,109

\* Estatisticamente significativa (p<0,05)

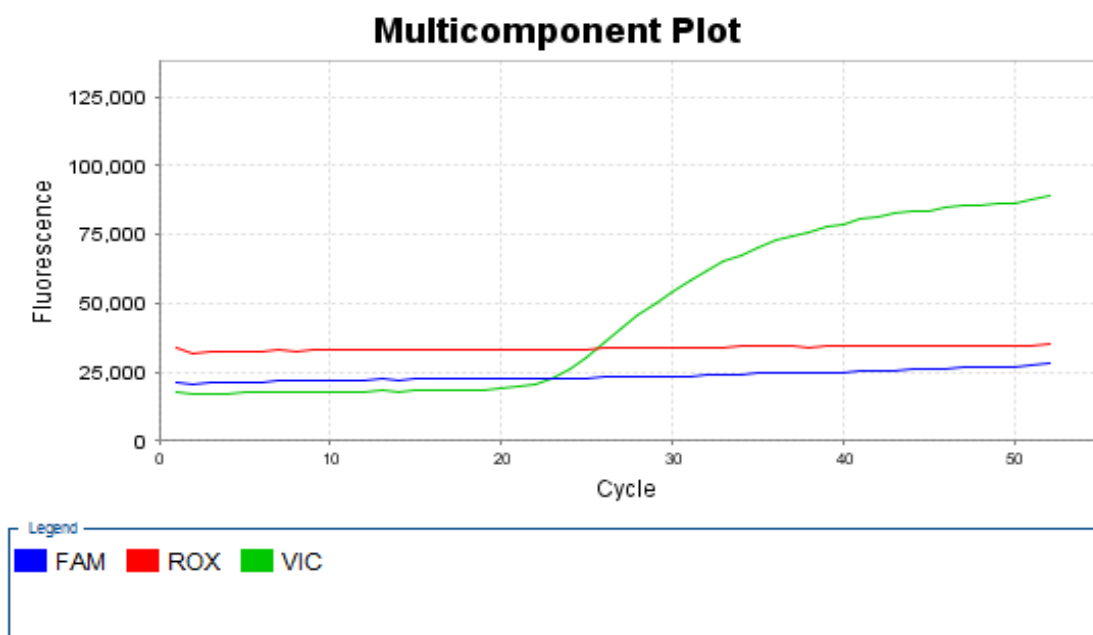
Fonte: Da autora.

Figura 2 – Genotipagem individual indicando amostra homozigoto para FAM (alelo C).



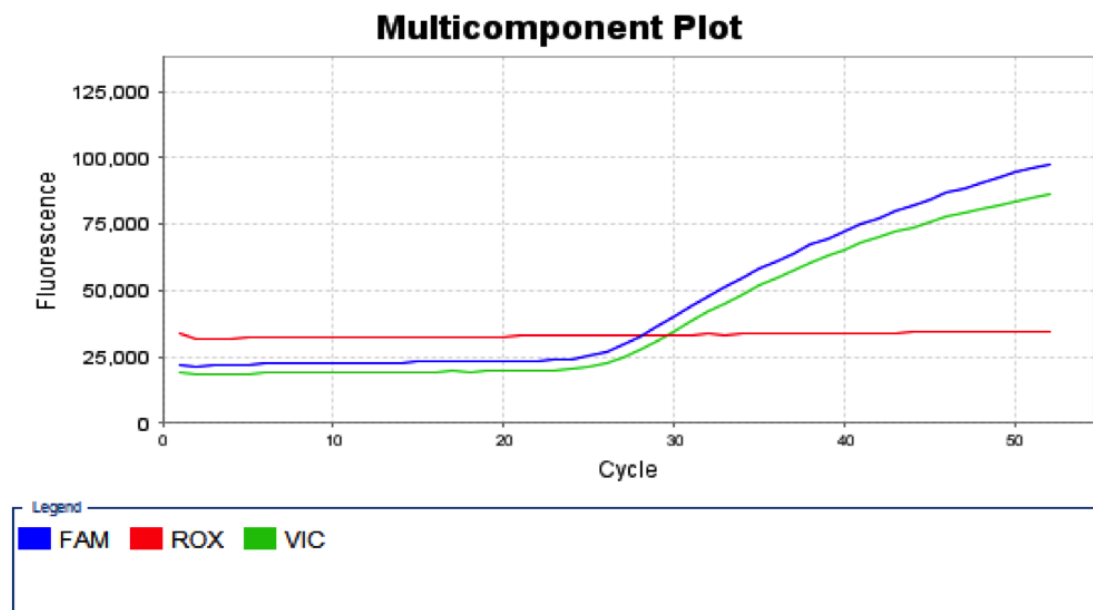
Fonte: Da autora.

Figura 3 – Genotipagem individual indicando amostra homozigoto para VIC (alelo T).



Fonte: Da autora.

Figura 4 – Genotipagem individual indicando amostra Heterozigoto FAM/VIC.



Fonte: Da autora.

## DISCUSSÃO

Este trabalho investigou a influência do polimorfismo *TaqI* no gene receptor da vitamina D (VDR) com a severidade da RRAE, em pacientes asmáticos, durante o tratamento ortodôntico.

Diversos estudos<sup>28-32</sup> tem sugerido a etiologia multifatorial da RRAE. Fatores relacionados à idade<sup>33,34</sup>, gênero<sup>35,36</sup>, maloclusão<sup>37,38</sup>, exodontia<sup>39,40</sup>, tempo de tratamento<sup>36,41</sup>, ERM<sup>42,43</sup> e uso de elásticos intermaxilares<sup>44</sup>, tem sido associados a esta patologia. No presente estudo, os grupos Asma e Controle foram compatibilizados quanto à idade, gênero, tipo de má oclusão, tipo de mecânica ortodôntica, tempo de tratamento, severidade do apinhamento, trespasse horizontal, características cefalométricas e uso de medicamentos para asma (Tabela 1). Isso porque esses fatores poderiam, de forma individual ou conjunta, contribuir para o aumento da severidade da RRAE<sup>32</sup>. Dessa forma, foi possível isolar a presença de asma como fator diferencial entre os dois grupos, permitindo a comparação proposta ao início do estudo.

A asma tem sido relacionada como fator predisponente para o desenvolvimento da RRAE<sup>12,45</sup>. Constitui uma doença crônica das vias aéreas e se caracteriza pela obstrução reversível do fluxo aéreo<sup>4</sup>. McNab et al.<sup>12</sup>, ao determinar a incidência e gravidade da RRAE em pacientes asmáticos, verificaram por meio de radiografias panorâmicas que esses pacientes apresentaram uma chance onze vezes maior (OR =11,4) de desenvolver RRAE após o tratamento ortodôntico. Embora a radiografia panorâmica já tenha sido utilizada em estudos prévios<sup>46,47</sup> para esta finalidade, sabe-se que este método pode superestimar os resultados em até 20% quando comparado à radiografia periapical<sup>36</sup>, o que comprometeria sobremaneira os resultados. Por isso, em nosso estudo, houve o cuidado em realizar radiografias periapicais padronizadas, que representam o método mais indicado para avaliação da RRAE<sup>31,36</sup>. Ainda com relação a esta análise, optou-se por categorizar a RRAE em: 0 a 2mm e maior que 2mm. Isso porque existe uma dificuldade em quantificar com precisão reabsorções radiculares abaixo de 2mm<sup>34</sup> e considera-se que um arredondamento apical é esperado após o a realização do tratamento ortodôntico<sup>48</sup>. Desta forma, o primeiro subgrupo (até 2mm) representou casos com RRAE clinicamente aceitável; enquanto a segunda categoria (>2mm) representou pacientes com RRAE mais severa, facilitando a avaliação dos dados.

Paralelamente, estudos epidemiológicos confirmaram a existência de uma relação direta entre a severidade da asma e a deficiência de vitamina D<sup>21,49-51</sup>. A vitamina D representa um fator importante para o desenvolvimento

do tecido ósseo, pois participa de forma ativa na manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo<sup>52</sup>. Além disso, está envolvida na função neuromuscular e na inflamação<sup>53</sup>. Porém, além dos níveis séricos, a vitamina D depende da presença de receptores (VDR) para seu correto funcionamento<sup>15</sup>. O VDR é uma proteína nuclear, membro da família de receptores de hormônios esteroidais<sup>54,55</sup>, expresso em diferentes células como osteoblastos<sup>16</sup>, linfócitos, macrófagos e células B pancreáticas<sup>17</sup>. Variações no gene desse receptor, denominadas polimorfismo, podem determinar defeitos ou até a incapacidade completa da ligação da vitamina D com seu receptor, ocasionando uma hipovitaminose D, mesmo em indivíduos com níveis séricos ótimos<sup>15</sup>. Por isso, o estudo da associação do polimorfismo no gene da vitamina D com a suscetibilidade a asma foi realizado por Maalmi et al.<sup>50</sup>, porém em indivíduos não tratados ortodonticamente. Assim como já foi investigada a associação desse polimorfismo com a predisposição à RRAE durante o tratamento ortodôntico, mas em indivíduos saudáveis<sup>22</sup>. Dessa forma, esse é o primeiro estudo a relacionar o polimorfismo no gene receptor da vitamina D com a RRAE, em pacientes asmáticos, durante o tratamento ortodôntico.

No presente estudo, verificou-se associação entre o polimorfismo *TaqI* no gene VDR com a RRAE, em pacientes asmáticos tratados ortodonticamente ( $p=0.012$ ) (Tabela 5). No grupo asma, a maioria dos indivíduos da amostra (71,4%), apresentaram o genótipo heterozigoto, assim como no estudo de Fontana et al.<sup>22</sup> e 28,6% eram homozigoto T/T. Também observou-se que indivíduos asmáticos heterozigotos apresentaram 1,8 vezes mais chances de desenvolver RRAE mais severa após o tratamento ortodôntico (OR=1,868; 95%IC = 1,336 – 2,613;  $p=0,0001$ ). Em contrapartida, verificou-se que indivíduos asmáticos portadores do genótipo C/C não apresentaram reabsorção radicular. Uma justificativa para esses resultados seria o fato de que o polimorfismo *TaqI* no alelo C do gene VDR encontra-se relacionado ao aumento da estabilidade e expressão do RNA mensageiro, conferindo assim um fator protetor à RRAE<sup>56</sup>. Fontana et al.<sup>22</sup> também relataram esses resultados em seu estudo e acrescentaram, ainda, que esse efeito protetor foi menor em indivíduos tratados ortodonticamente comparado àqueles não tratados. Além disso, mediadores inflamatórios presentes na asma poderiam contribuir para o aumento na severidade da RRAE. Sendo assim, outros

estudos são necessários para elucidar esse mecanismo de proteção do alelo C, associado à cronicidade e ao caráter inflamatório da asma.

O presente estudo avaliou a RRAE em pacientes asmáticos, uma vez que a asma tornou-se um problema crescente de Saúde Pública. Além disso, a prevalência da RRAE é alta<sup>57</sup> e embora algum grau de RRAE seja esperado durante o ortodôntico<sup>48</sup>, mais de um terço dos pacientes submetidos à mecânica ortodôntica apresentam experiência de reabsorção radicular maior que 3mm, e 2 a 5% da população demonstram reabsorção superior a 5mm<sup>58,59</sup>.

Considerando que pacientes asmáticos apresentam um maior risco de desenvolver RRAE mais severa, associado a fatores genéticos, cuidados adicionais devem ser tomados durante a instituição do plano de tratamento ortodôntico. Assim, a genética molecular pode representar um exame complementar e contribuir na implementação de medidas preventivas para o controle da RRAE, durante o tratamento ortodôntico.

## CONCLUSÕES

O polimorfismo (rs 731236) no gene VDR está associado à RRAE em pacientes asmáticos. Os resultados descritos no presente estudo sugerem que o genótipo heterozigoto apresenta 1,8 mais chance de desenvolver RRAE mais severa, em pacientes asmáticos, durante o tratamento ortodôntico.

## REFERENCIAS

1. Bandeira AM, Oltramari-Navarro PV, de Lima Navarro R, de Castro Ferreira Conti AC, de Almeida MR, Fernandes KB. Three-dimensional upper-airway assessment in patients with bronchial asthma. *Angle Orthod.* 2013 Aug 29. [Epub ahead of print].
2. Boon NC, NR; Walker, BR; Hunter, JA. *Davidson's Principles and Practice of Medicine.* Elsevier, editor.: Elsevier; 2006.
3. Daneshmandi S, Pourfathollah AA, Pourpak Z, Heidarnazhad H, Kalvanagh PA. Cytokine gene polymorphism and asthma susceptibility, progress and control level. *Mol Biol Rep.* 2012 Feb;39(2):1845-53.
4. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med.* 2002;53:477-98.
5. Kay AB. Eosinophils and asthma. *N Engl J Med.* 1991 May



23;324(21):1514-5.

6. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. Dec;10(12):838-48.
7. Machado CC, Nojima Mda C, Rodrigues e Silva PM, Mandarim-de-Lacerda CA. Histomorphometric study of the periodontal ligament in the initial period of orthodontic movement in Wistar rats with induced allergic asthma. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012 Sep;142(3):333-8.
8. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res*. 2010 Oct;89(10):1135-41.
9. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod*. 1967 Oct;53(10):721-45.
10. Davidovitch ZeE, Mah JE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 2000.
11. Davidovitch ZeE, Norton LAE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 1996.
12. McNab S, Battistutta D, Taverne A, Symons AL. External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 Nov;116(5):545-51.
13. Nishioka M, Ioi H, Nakata S, Nakasima A, Counts A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. *Angle Orthod*. 2006 Jan;76(1):103-8.
14. Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2003 Aug 15;12(16):1973-9.
15. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, et al. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):742-59.
16. Misof BM, Roschger P, Tesch W, Baldock PA, Valenta A, Messmer P, et al. Targeted overexpression of vitamin D receptor in osteoblasts increases calcium concentration without affecting structural properties of bone mineral crystals. *Calcif Tissue Int*. 2003 Sep;73(3):251-7.
17. Mathieu C, van Etten E, Decallonne B, Guilietti A, Gysemans C, Bouillon R, et al. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):449-52.
18. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnott D, Schurr E, et al.

Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 1;170(9):967-73.

19. Wjst M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet*. 2005;6:2.

20. Ehlal MS, Bener A, Sabbah A. Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. Jun;43(3):81-8.

21. Brehm JM, Acosta-Perez E, Klei L, Roeder K, Barmada M, Boutaoui N, et al. Vitamin D insufficiency and severe asthma exacerbations in Puerto Rican children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jul 15;186(2):140-6.

22. Fontana ML, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML, Thum L, et al. Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012 Sep;142(3):339-47.

23. Esteves T, Ramos AL, Pereira CM, Hidalgo MM. Orthodontic root resorption of endodontically treated teeth. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):119-22.

24. Mohandesan H, Ravanmehr H, Valaei N. A radiographic analysis of external apical root resorption of maxillary incisors during active orthodontic treatment. *Eur J Orthod*. 2007 Apr;29(2):134-9.

25. Linge BO, Linge L. Apical root resorption in upper anterior teeth. *Eur J Orthod*. 1983 Aug;5(3):173-83.

26. 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.

27. Fleiss JL. Confidence intervals vs significance tests: quantitative interpretation. *Am J Public Health*. 1986 May;76(5):587-8.

28. Abass SK, Hartsfield JK, Jr., Al-Qawasmi RA, Everett ET, Foroud TM, Roberts WE. Inheritance of susceptibility to root resorption associated with orthodontic force in mice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 Dec;134(6):742-50.

29. Artun J, Smale I, Behbehani F, Doppel D, Van't Hof M, Kuijpers-Jagtman AM. Apical root resorption six and 12 months after initiation of fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthod*. 2005 Nov;75(6):919-26.

30. Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Al-Qawasmi RA. Genetic Factors in External Apical Root Resorption and Orthodontic Treatment. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(2):115-22.

31. Sherrard JF, Rossouw PE, Benson BW, Carrillo R, Buschang PH. Accuracy and reliability of tooth and root lengths measured on cone-beam computed tomographs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010 Apr;137(4Suppl):S100-8.

32. Weltman B, Vig KW, Fields HW, Shanker S, Kaizar EE. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* Apr;137(4):462-76; discussion 12A.
33. Harris EF, Robinson QC, Woods MA. An analysis of causes of apical root resorption in patients not treated orthodontically. *Quintessence Int.* 1993 Jun;24(6):417-28.
34. Linge L, Linge BO. Patient characteristics and treatment variables associated with apical root resorption during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991 Jan;99(1):35-43.
35. Chan E, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: part 7. Extent of root resorption under areas of compression and tension. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Apr;129(4):504-10.
36. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 May;119(5):505-10.
37. Brin I, Bollen AM. External apical root resorption in patients treated by serial extractions followed by mechanotherapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 Feb;139(2):e129-34.
38. Mirabella AD, Artun J. Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995 Jul;108(1):48-55.
39. Pandis N, Nasika M, Polychronopoulou A, Eliades T. External apical root resorption in patients treated with conventional and self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008 Nov;134(5):646-51.
40. Zhuang L, Bai Y, Meng X. Three-dimensional morphology of root and alveolar trabecular bone during tooth movement using micro-computed tomography. *Angle Orthod.* 2011 May;81(3):420-5.
41. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997 Mar;111(3):301-9.
42. Liu Z, Xu J, E L, Wang D. Ultrasound enhances the healing of orthodontically induced root resorption in rats. *Angle Orthod.* 2012 Jan;82(1):48-55.
43. Vardimon AD, Levy T, Weinreb M. Maxillary incisor root resorption after rapid palatal expansion in *Felis catus*. *Eur J Oral Sci.* 2005 Feb;113(1):41-6.
44. Mavragani M, Vergari A, Selliseth NJ, Boe OE, Wisth PL. A radiographic comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with a standard edgewise and a straight-wire edgewise technique. *Eur J Orthod.* 2000 Dec;22(6):665-74.

45. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. *Angle Orthod.* 2002 Apr;72(2):180-4.
46. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Faust DM, et al. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. *Eur J Orthod.* 2006 Feb;28(1):13-9.
47. Dudic A, Giannopoulou C, Leuzinger M, Kiliaridis S. Detection of apical root resorption after orthodontic treatment by using panoramic radiography and cone-beam computed tomography of super-high resolution. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Apr;135(4):434-7.
48. Kurol J, Owman-Moll P, Lundgren D. Time-related root resorption after application of a controlled continuous orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Sep;110(3):303-10.
49. Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 157(2):168-75.
50. Maalmi H, Sassi FH, Berraies A, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study. *Hum Immunol.* 2013 Feb;74(2):234-40.
51. Montero-Arias F, Sedo-Mejia G, Ramos-Esquivel A. Vitamin d insufficiency and asthma severity in adults from costa rica. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013 Sep;5(5):283-8.
52. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition.* 2011 Apr;27(4):399-404.
53. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics.* 1991 Sep;11(1):168-73.
54. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 Aug;26(5):662-87.
55. Nezbedova P, Brtko J. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inducible transcription factor and its role in the vitamin D action. *Endocr Regul.* 2004 Mar;38(1):29-38.
56. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004 Sep 1;338(2):143-56.
57. Castro IO, Alencar AH, Valladares-Neto J, Estrela C. Apical root resorption due to orthodontic treatment detected by cone beam computed tomography. *Angle Orthod.* 2013 Mar;83(2):196-203.

58. Killiany DM. Root resorption caused by orthodontic treatment: an evidence-based review of literature. *Semin Orthod*. 1999 Jun;5(2):128-33.
59. Taithongchai R, Sookkorn K, Killiany DM. Facial and dentoalveolar structure and the prediction of apical root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1996 Sep;110(3):296-302.

## 6 CONCLUSÃO

Verificou-se um desequilíbrio de ligação do polimorfismo da  $1L-1\beta$  com a RRAE no grupo asmático, ligado a indivíduos portadores de pelo menos um alelo 2 ( $p=0,037$ ). Além disso, observou-se que indivíduos asmáticos portadores do genótipo heterozigoto para o gene VDR apresentam 1,8 mais chances de desenvolver RRAE mais severa (OR=1,868; 95%IC = 1,336 – 2,613;  $p=0,0001$ ).

## REFERÊNCIAS

1. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Mar;123(3):242-52.
2. Kurol J, Owman-Moll P, Lundgren D. Time-related root resorption after application of a controlled continuous orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Sep;110(3):303-10.
3. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Feb;125(2):168-77.
4. Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *Eur J Orthod.* 2005 Jun;27(3):215-25.
5. Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C, Jaeger A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodontal Res.* 2003 Jun;38(3):324-32.
6. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Mar;12(1):9-18.
7. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJ, Gontijo AI, et al. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Oct;136(4):542-6.
8. SilvaFilho JM. Relação entre o polimorfismo no gene IL-1 $\beta$  e a reabsorção apical externa em dentes tratados ortodonticamente. Londrina: UNOPAR; 2008.
9. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnott D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Nov 1;170(9):967-73.
10. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 Aug;26(5):662-87.
11. Kim S, Shevde NK, Pike JW. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates cyclic vitamin D receptor/retinoid X receptor DNA-binding, co-activator recruitment, and histone acetylation in intact osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2005 Feb;20(2):305-17.
12. Davidovitch Z, Mah JE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 2000.

13. Davidovitch ZeE, Norton LAE. Biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Boston, MA: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics; 1996.
14. McNab S, Battistutta D, Taverne A, Symons AL. External apical root resorption of posterior teeth in asthmatics after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 Nov;116(5):545-51.
15. Nishioka M, Ioi H, Nakata S, Nakasima A, Counts A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. *Angle Orthod*. 2006 Jan;76(1):103-8.
16. Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T, Openshaw P, Johnston SL. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Jul;10(7):459-71.
17. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2010. [database on the Internet]. 2010 [cited 28 maio 2013].
18. Boon NC, NR; Walker, BR; Hunter, JA. Davidson's Principles and Practice of Medicine. Elsevier, editor.: Elsevier; 2006.
19. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005 Apr;5(2):161-6.
20. Machado CC, Nojima Mda C, Rodrigues e Silva PM, Mandarim-de-Lacerda CA. Histomorphometric study of the periodontal ligament in the initial period of orthodontic movement in Wistar rats with induced allergic asthma. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012 Sep;142(3):333-8.
21. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med*. 2002;53:477-98.
22. Kay AB. Eosinophils and asthma. *N Engl J Med*. 1991 May 23;324(21):1514-5.
23. Lloyd CM, Hessel EM. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):838-48.
24. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res*. 2010 Oct;89(10):1135-41.
25. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod*. 1967 Oct;53(10):721-45.
26. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221-40.
27. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):597-608.



28. Castro IO, Alencar AH, Valladares-Neto J, Estrela C. Apical root resorption due to orthodontic treatment detected by cone beam computed tomography. *Angle Orthod.* Mar;83(2):196-203.
29. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence Int.* 1999 Jan;30(1):9-25.
30. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993 Feb;103(2):138-46.
31. Taithongchai R, Sookkorn K, Killiany DM. Facial and dentoalveolar structure and the prediction of apical root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Sep;110(3):296-302.
32. Abass SK, Hartsfield JK, Jr., Al-Qawasmi RA, Everett ET, Foroud TM, Roberts WE. Inheritance of susceptibility to root resorption associated with orthodontic force in mice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008 Dec;134(6):742-50.
33. Artun J, Smale I, Behbehani F, Doppel D, Van't Hof M, Kuijpers-Jagtman AM. Apical root resorption six and 12 months after initiation of fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthod.* 2005 Nov;75(6):919-26.
34. Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Al-Qawasmi RA. Genetic Factors in External Apical Root Resorption and Orthodontic Treatment. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(2):115-22.
35. Sherrard JF, Rossouw PE, Benson BW, Carrillo R, Buschang PH. Accuracy and reliability of tooth and root lengths measured on cone-beam computed tomographs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010 Apr;137(4 Suppl):S100-8.
36. Weltman B, Vig KW, Fields HW, Shanker S, Kaizar EE. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010 Apr;137(4):462-76; discussion 12A.
37. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Weaver MR, Foroud TM, Faust DM, et al. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. *Eur J Orthod.* 2006 Feb;28(1):13-9.
38. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997 Mar;111(3):301-9.
39. Ngan DC, Kharbanda OP, Byloff FK, Darendeliler MA. The genetic contribution to orthodontic root resorption: a retrospective twin study. *Aust Orthod J.* 2004 May;20(1):1-9.
40. Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod.* 1975 May;67(5):522-39.

41. Alexander SA. Levels of root resorption associated with continuous arch and sectional arch mechanics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Sep;110(3):321-4.
42. Brin I, Tulloch JF, Koroluk L, Philips C. External apical root resorption in Class II malocclusion: a retrospective review of 1- versus 2-phase treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Aug;124(2):151-6.
43. Janson GR, De Luca Canto G, Martins DR, Henriques JF, De Freitas MR. A radiographic comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with 3 different fixed appliance techniques. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Sep;118(3):262-73.
44. Mirabella AD, Artun J. Risk factors for apical root resorption of maxillary anterior teeth in adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995 Jul;108(1):48-55.
45. Sameshima GT, Sinclair PM. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 May;119(5):505-10.
46. Kook YA, Park S, Sameshima GT. Peg-shaped and small lateral incisors not at higher risk for root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Mar;123(3):253-8.
47. Ren H, Chen J, Deng F, Zheng L, Liu X, Dong Y. Comparison of cone-beam computed tomography and periapical radiography for detecting simulated apical root resorption. *Angle Orthod.* 2013 Mar;83(2):189-95.
48. Dudic A, Giannopoulou C, Leuzinger M, Kiliaridis S. Detection of apical root resorption after orthodontic treatment by using panoramic radiography and cone-beam computed tomography of super-high resolution. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Apr;135(4):434-7.
49. Fontana ML, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML, Thum L, et al. Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Sep;142(3):339-47.
50. Maalmi H, Sassi FH, Berraies A, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study. *Hum Immunol.* 2013 Feb;74(2):234-40.
51. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1-2):1-12.
52. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics.* 1991 Sep;11(1):168-73.

53. Karkoszka H, Chudek J, Strzelczyk P, Wiecek A, Schmidt-Gayk H, Ritz E, et al. Does the vitamin D receptor genotype predict bone mineral loss in haemodialysed patients? *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Aug;13(8):2077-80.
54. de Brito Junior RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, de Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2004 Aug;75(8):1090-5.
55. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2004 Jan;75(1):30-6.
56. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001 Mar;119(3):307-12.
57. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 1996 Jan;75(1):562-7.
58. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol*. 1994 May;65(5):423-8.
59. Gulden N, Eggermann T, Zerres K, Beer M, Meinelt A, Diedrich P. Interleukin-1 polymorphisms in relation to external apical root resorption (EARR). *J Orofac Orthop*. 2009 Jan;70(1):20-38.
60. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition*. 2011 Apr;27(4):399-404.
61. Holick, editor. *vitamin D: molecular biology, physiology, and clinical applications*. Totowa, N.J.: Humana Press; 1999.
62. Shinkyō R, Sakaki T, Kamakura M, Ohta M, Inouye K. Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 5;324(1):451-7.
63. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, et al. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):742-59.
64. Misof BM, Roschger P, Tesch W, Baldock PA, Valenta A, Messmer P, et al. Targeted overexpression of vitamin D receptor in osteoblasts increases calcium concentration without affecting structural properties of bone mineral crystals. *Calcif Tissue Int*. 2003 Sep;73(3):251-7.
65. Mathieu C, van Etten E, Decallonne B, Guilietti A, Gysemans C, Bouillon R, et al. Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as modulators in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):449-52.

66. Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Sep;105(3):191-9; quiz 200-2, 17.
67. Wjst M. Variants in the vitamin D receptor gene and asthma. *BMC Genet.* 2005;6:2.
68. Bener A, Ehlayel MS, Tulic MK, Hamid Q. Vitamin D deficiency as a strong predictor of asthma in children. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012 157(2):168-75.
69. Brehm JM, Acosta-Perez E, Klei L, Roeder K, Barmada M, Boutaoui N, et al. Vitamin D insufficiency and severe asthma exacerbations in Puerto Rican children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Jul 15;186(2):140-6.
70. Montero-Arias F, Sedo-Mejia G, Ramos-Esquivel A. Vitamin d insufficiency and asthma severity in adults from costa rica. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013 Sep;5(5):283-8.
71. Ehlayel MS, Bener A, Sabbah A. Is high prevalence of vitamin D deficiency evidence for asthma and allergy risks? *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2011 Jun;43(3):81-8.
72. Sutherland ER, Goleva E, Jackson LP, Stevens AD, Leung DY. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Apr 1;181(7):699-704.

## APÊNDICES

## Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE DO NORTE DO PARANÁ**  
**PESQUISA SOBRE PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA À REABSORÇÃO**  
**RADICULAR APICAL EXTERNA E TRATAMENTO ORTODÔNTICO EM**  
**PACIENTES ASMÁTICOS.**

**Carta de informação ao paciente**

A Unopar, através de seu curso de Mestrado em Odontologia, pretende desenvolver uma pesquisa para estudar a reabsorção radicular (diminuição do comprimento da raiz dos dentes) que pode ocorrer durante o tratamento ortodôntico. Esta pesquisa será útil para que em uma etapa posterior, ações de controle e prevenção deste tipo de alteração sejam planejadas e desenvolvidas por professores e alunos.

O estudo terá os seguintes objetivos:

- Avaliar a predisposição genética à reabsorção radicular. Para tanto, serão adotados procedimentos que já foram amplamente utilizados em pesquisas/estudos anteriores e que se mostraram totalmente seguros. Resumidamente serão realizados:
  - Coleta de saliva por meio de um bochecho com solução de glicose para coletar algumas células que servirão para o exame laboratorial.
  - O exame de laboratório tem a finalidade de verificar se a reabsorção radicular é uma condição genética que passa de pai para filho e se essa reabsorção é maior em **pacientes asmáticos**.

Será garantido ao paciente:

- receber respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.
- a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.
- a segurança de que não será identificada e que se manterá o caráter confidencial da informação relacionada com sua privacidade.

Terminada a pesquisa, os resultados que são de minha inteira responsabilidade estarão a sua disposição.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o(a) Sr(a) \_\_\_\_\_, portador(a) da célula de identidade \_\_\_\_\_, após leitura da carta de informação ao paciente, devidamente explicada pelos profissionais, ciente dos procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu consentimento livre e esclarecido, concordando em participar da pesquisa proposta, sem qualquer despesa e sem qualquer tipo de pagamento por esta participação.

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador

Londrina, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de 2012.

**ANEXOS**

## Anexo A - Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação do polimorfismo do gene Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e a reabsorção radicular apical externa em pacotes asmáticos tratados ortodonticamente

**Pesquisador:** Patrícia Vanessa Pedroni Olimari-Naurio

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima);

**Versão:** 1

**CAAE:** 10705113.4.0000.0103

**Instituição Proponente:** Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 276.648

**Data da Relatoria:** 29/03/2013

## Apresentação do Projeto:

A reabsorção radicular apical externa (RRAE) é um efeito colateral com um ao tratamento ortodôntico. Esse efeito indesejável apresenta alguns fatores associados, dentre eles o componente genético. Estudos recentes mostram uma associação entre o polimorfismo do gene da Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) com a reabsorção radicular na movimentação ortodôntica. A RRAE também tem sido relacionada aos pacotes asmáticos, uma vez que mediadores inflamatórios dessa patologia podem atuar sinergicamente nesse processo. A amostra será composta por 40 pacotes, de ambos os gêneros, com idades entre 10 e 30 anos, divididos em 2 grupos: G1, pacotes asmáticos; G2, pacotes não portadores de asma (grupo controle). Para tanto, serão realizadas duas análises: 1) radiográfica: radiografias periapicais de incisivos superiores e inferiores realizadas previamente ao tratamento ortodôntico e 24 meses após o início do tratamento, as quais serão avaliadas com o auxílio de um paquímetro digital da marca Mitutoyo (Mitutoyo S/A Americana LTDA, Indústria Brasileira, Suzano-SP) com capacidade de 150mm e resolução de 0,01mm, por meio da medida do comprimento radicular nos dois períodos experimentais; 2) molecular: a extração do DNA será obtida a partir de células epiteliais da mucosa bucal dos pacotes e a análise do polimorfismo do gene da IL-1 $\beta$  será realizada por meio de PCR.

Endereço: Av. Paraíso 875

Bairro: Jardim Pira

CEP: 86.041-140

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43) 3011-7334

E-mail: pesquisa@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Contribuição ao Parecer 276441

Os resultados obtidos para os dois grupos se são comparados e estatisticamente utilizado o programa SPSS, com nível de significância de 5%.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo desta trabalho é de determinar se pacientes asmáticos sob tratamento ortodôntico apresentam maior incidência ou gravidade da RRAE em dentes anteriores, comparados àqueles que não apresentam esta doença crônica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos Inerente a técnica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Indicações:**

Não se aplica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em reunião, após apresentação do relatório consolidado e análise pelos membros do CEP o protocolo foi aprovado sob o aspecto ético.

Endereço: Av. Paris 875

Bairro JardimPira

CEP: 88.041-140

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43) 3211-7224

E-mail: pesquisa@unopar.br

UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Continuação Formosa 276644

LONDINA, 20 de Maio de 2013

---

Aprovado por:  
Hélio Hiroshi Sugimoto  
(Coordenador)

Endereço: Av. Poço das Antas

Bairro: Jardim Pira

CEP: 86.041-140

UF: PR Município: LONDINA

Telefone: (49) 3231-1122

E-mail: [plataforma@unopar.br](mailto:plataforma@unopar.br)